Ein Beitrag zur Analyse der Thyroxinwirkung im Kaulquappenversuch und zur Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOCTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT BASEL

VON

Hermann MOSER
aus Basel

GENÈVE
IMPRIMERIE ALBERT KUNDIG
1950

Ein Beitrag zur Analyse der Thyroxinwirkung im Kaulquappenversuch und zur Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOCTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT BASEL

VON

Hermann MOSER

aus Basel

GENÈVE

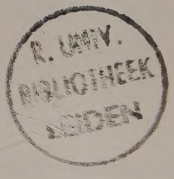
IMPRIMERIE ALBERT KUNDIG

1950

Genehmigt von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. R. Geigy *und* Dr. P. Huber.

Basel, den 22. Februar 1949.

Prof. Dr. M. Geiger,
Dekan.



Separatabdruck aus *Revue suisse de Zoologie*, Bd. 57, Fasc. supplt nº 2, Jahr 1950.

CURRICULUM VITAE

Am 26. Juni 1921 wurde ich, Hermann Moser, von Basel, in Basel geboren. Ich bin der Sohn des Adolf Moser, Geschäftsinhaber, und seiner Gattin Sophie, geb. Keller, wohnhaft in Basel.

In meiner Heimatstadt besuchte ich während den Jahren 1928—1932 die Primarschule und zwischen 1932 und 1940 das Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium. Nach bestandener Maturitätsprüfung liess ich mich im Frühjahr 1940 an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel immatrikulieren.

In den Jahren zwischen 1940—1945 unterzog ich mich der Ausbildung in Zoologie, Botanik, Physik, Chemie und physikalischer Chemie. Im Winter-Semester 1947/48 und im Sommer-Semester 1948 war ich Assistent in den Kursen von Herrn Prof. Dr. Rud. Geigy.

Ich habe die Vorlesungen und Kurse folgender Herren Dozenten besucht:

Buxtorf, Edelbacher, Erlenmeyer, Geiger, Geigy, Hagenbach, Handschin, Hediger, Huber, Kuhn, Miescher, Mislin, Nuesch, Ostrowski, Ruggli, Portmann, Schuepp, Senn, Spiess, Vischer, Wehrli.

Die vorliegende Dissertation begann ich im Winter-Semester 1944/45 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rud. Geigy.

REVUE SUISSE DE ZOOLOGIE
Tome 57, Fascicule supplémentaire nº 2. — Septembre 1950.

Ein Beitrag zur Analyse der Thyroxinwirkung im Kaulquappenversuch und zur Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems

von

Hermann MOSER

Basel

Mit 47 Textabbildungen und 4 Tabellen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 3

Abschnitt I. — Material und Methodik 7

1. Wahl, Beschaffung und Aufzucht des Untersuchungsobjektes 7
2. Die Gewinnung des Versuchs-Ausgangsmaterials 7
3. Allgemeine Methodik der Thyroxinversuche 8
4. Die Messtechnik 14
5. Die histologische Technik 18

Abschnitt II. — Ablauf und Induktion der Thyroxin-metamorphose 19

1. Der Metamorphoseablauf und seine biometrische Analyse 19
2. Die Ermittlung der Reaktionscharakteristiken 31

3. Die Definition der Reaktionskriterien und die Bestimmung der regionalen Latenzzeit 34
4. Die Induktion der Metamorphose-Teilprozesse 36
5. Die Konzentrationsabhängigkeit der Thyroxinwirkung und ihre Interpretation 46

Abschnitt III. — Das Zustandekommen der frühbereitschaft des Metamorphose-reaktionssystems 54

A. Charakteristik des Bereitschaftszustandes:

1. Definition und Nachweis des Bereitschaftszustandes 54
2. Die Regionalspezifität des Bereitschaftszustandes 55
3. Die Phasenspezifität des Bereitschaftszustandes . 56
4. Die Artspezifität des Bereitschaftszustandes . . . 58
5. Bereitschaftszustand und morphogenetische Leistungsfähigkeit 59

B. Die frühlarvale Normogenese von *Rana temporaria* L.:

1. Die Stadien der frühlarvalen Normogenese . . . 65
2. Die biometrische Analyse einiger Wachstums- und Abbauvorgänge der frühlarvalen Normogenese . 71
3. Das Muster der frühlarvalen Normogenese 74
4. Die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese 76

C. Der normogenetische Bereitschaftsbeginn:

1. Beginn und Verlauf der Thyroxin-Frühmetamorphose 79
2. Vorstellungen über das Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems 82
3. Der regionale Ablauf des Metamorphose-Induktionsvorganges bei Thyroxineinwirkung auf noch nicht reaktionsbereite Entwicklungsstadien von Anurenkeimen und -larven 85
4. Die hypothetische Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit 92
5. Die empirische Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit: 100
   a) Versuchsführung 100
   b) Versuchsauswertung 101
   c) Versuchsergebnisse 103
6. Zusammenfassung zur theoretischen und experimentellen Analyse der Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit 109
7. Die experimentelle Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns 110

8. Das zeitliche Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft bei *Rana temporaria* L. 111
9. Die Abschätzung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns bei veränderter Aufzuchttemperatur 116

D. Normogenetischer Bereitschaftsbeginn und Differenzierungszustand der Anlagebezirke:

1. Das Verhalten der Hornkiefers 117
2. Das Verhalten der Unterlippe 119
3. Das Verhalten der zentralen Schwanzpartie . . . 121
4. Das Verhalten der Hinterextremitätenanlage . . 125

Diskussion der Ergebnisse:

1. Determination und Etablierung der Reaktionsbereitschaft 128
2. Zum Problem der Natur und Wirkungsweise der bereitschaftsbestimmenden Faktoren 130

Zusammenfassung der Ergebnisse 133
Zitierte Literatur 138

EINLEITUNG

Den Ausgangspunkt zur Kausalanalyse der Amphibienmetamorphose bildeten zweifellos die Schilddrüsen-Fütterungsversuche an Kaulquappen, deren Ergebnisse von J. F. Gudernatsch in den Jahren 1912—1914 veröffentlicht worden sind. Die bereits im Jahre 1905 von Nerking (zit. nach Roth, 1945) durchgeführten Schilddrüsenversuche haben wenig Beachtung gefunden und sind der Vergessenheit anheimgefallen. Verschiedene Autoren (Allen, 1916; Hoskins E. R. und M. M., 1917, 1919; Schulze, 1922; Romeis, 1923) vermochten in der Folge den eindeutigen Beweis dafür zu erbringen, dass die Anurenmetamorphose unter der Kontrolle des Schilddrüsenhormons steht. Allen (1918) konnte zeigen, dass thyroidektomierte Kaulquappen dauernd neoten bleiben und zu Riesenlarven auswachsen, während umgekehrt thyreoprive Kaulquappen durch Verfütterung von Schilddrüsensubstanz zur Metamorphose veranlasst werden. Diese grundlegenden experimentellen Befunde wurden durch zahlreiche morphologische und biometrische

Studien über das Verhalten der Schilddrüse vor, während und nach der normalen Amphibienmetamorphose (Adler, 1916; Allen, 1919; Mayerowna, 1922; Uhlenhuth, 1927; Etkin, 1930/1936; Grant, 1931/1932; Morita, 1932; Aleschin, 1935/36; Meisenheimer, 1936; Gasche, 1939) erhärtet und ergänzt. Als es im Jahre 1927 Harington und Barger gelang, das von Kendall (1915) aus der Schilddrüse isolierte Thyroxin synthetisch herzustellen und seine chemische Struktur einwandfrei aufzuklären, waren die Grundlagen zu einer verfeinerten Analyse der experimentellen Amphibienmetamorphose geschaffen.

Die ersten Untersuchungen über die metamorphosebestimmenden Faktoren galten zwangsläufig der Erforschung des Metamorphose-Aktionssystems (Schilddrüse, Hypophyse, etc.). Die erfolgreiche Metamorphose-Induktion bei verschiedenen spontan metamorphosierenden und fakultativ-neotenen Amphibienarten durch Schilddrüsentransplantation und -Fütterung führte zur Einsicht, dass dem Schilddrüsenhormon der Charakter eines artunspezifischen Auslösers der Anuren- und Urodelenmetamorphose zukommt. Als es indessen trotz mehrfacher Versuche stets misslang, den obligat neotenen Perennibranchiaten Necturus, dessen eigene Schilddrüse sich als funktionstüchtig erwies (Swingle, 1922), durch Schilddrüsenbehandlung zur Umwandlung zu zwingen (Huxley und Hogben, 1922), erkannte man in zunehmendem Masse die ausschlaggebende Bedeutung, die dem Reaktionssystem für das Zustandekommen der Amphibienmetamorphose zuzumessen ist. Dabei verstehen wir unter dem Metamorphose-Reaktionssystem der Amphibienlarve den Mosaik jener Körperterritorien, die im Zustande ihrer Reaktionsbereitschaft mit Abbau (Körperpartien mit larvaler Potenz), mit Entwicklungsbeschleunigung (Körperpartien mit adulter Bestimmung) oder mit Umgestaltung und Weiterentwicklung (Körperteile mit larvo-adulter Bestimmung) auf das Schilddrüsenhormon anzusprechen vermögen.

Entsprechend dem Verhalten des Metamorphose-Aktionssystems durchläuft auch das Metamorphose-Reaktionssystem eine ausgedehnte Phase der Entwicklung, bevor es durch das Schilddrüsenhormon zur Aktivität aufgerufen wird. Durch diesen Reifungsprozess erlangen die zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Körperterritorien nicht nur ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenreiz, sondern auch jenen Grad des Reaktionsver-

mögens, der für die Ausführung einer normalen, harmonischen Metamorphoseleistung ebenso ausschlaggebend ist wie die geordnete Tätigkeit der hormonalen Faktoren.

Obschon die Bedeutung, die diesem Reifungsprozess des reagierenden Substrates für das Zustandekommen eines lebensfähigen Jungfrosches zukommt, eine augenfällige ist, bildete er bisher noch nicht Gegenstand einer eingehenden Untersuchung. Das Augenmerk richtete sich vielmehr auf das Verhalten der Schilddrüse und der Hypophyse vor und während der Metamorphose. Von verschiedenen Autoren (Kollmann, 1919; Romeis, 1923; Kosmin und Resnitschenko, 1927; Krichel, 1931; Allen, 1932; Geigy, 1941 *a*) wurde bisher lediglich in präliminarischer Weise der Einfluss, den das Ausgangsalter auf die Reaktionsleistungen schilddrüsenbehandelter Anurenlarven ausübt, untersucht. Roth (1945) ist meines Wissens nach bisher der einzige Autor, der sich mit diesem Problem eingehender befasst hat. Seine Versuchsergebnisse scheinen aber insofern mit einer gewissen Unzulänglichkeit behaftet zu sein, als der erwähnte Autor weder eine hinreichende Konstanz der Versuchsbedingungen (Durchführung der Thyroxinversuche bei Zimmertemperatur während ausgedehnteren Versuchsperioden statt bei konstanter Thermostatentemperatur) eingehalten, noch den Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität auszuschalten resp. in hinreichendem Masse zu hemmen versucht hat. Ebenso wenig abgeklärt wie die Verhaltensänderungen, die das auf den Thyroxinreiz ansprechende Material mit steigendem Alter erfährt, ist die Frage nach dem Entwicklungsstadium, in dem sich die Thyroxinempfindlichkeit in der Anurenlarve etabliert (Geigy, 1941 *b*). Wohl zeigen die Experimente von Romeis (1923), dass sich nach frühzeitig einsetzender Schilddrüsenbehandlung bereits vom Jungkaulquappen-Stadium an äusserlich erkennbare Metamorphosesymptome abzuzeichnen beginnen. Wann sich hingegen aber die Reaktionsfähigkeit auf den Schilddrüsenreiz in den verschiedenen Anlagebezirken der Larve etabliert, lässt sich aus den Romeisschen Versuchen nicht ableiten.

Es rechtfertigt sich somit, die Verhaltensänderungen, die das Metamorphose-Reaktionssystem während der Larvalentwicklung erfährt, einer eingehenderen Analyse zu unterziehen. In der vorliegenden Arbeit beschränken wir uns darauf, einerseits die Kenntnisse über die Thyroxineinwirkung im Kaulquappen-Versuch zu

ergänzen und die Grundlagen zu unseren Untersuchungen über das Verhalten des Reaktionssystems zu schaffen, andererseits die Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems bei unserem Untersuchungsobjekt abzuklären. Dabei soll

1. ein objektives Verfahren zur Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns entwickelt und ausgearbeitet werden;
2. das zeitliche Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Thyroxin bei *Rana temporaria* entworfen werden;
3. der Differenzierungszustand festgehalten werden, den die Anlagebezirke bei Bereitschaftsbeginn aufweisen;
4. auf Grund der erhaltenen Ergebnisse das Problem der Natur und Wirkungsweise der bereitschaftsbestimmenden Faktoren diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit ist das Schwergewicht unserer Problematik auf die Frage nach dem Zustandekommen der Thyroxinempfindlichkeit verlagert. In einer geplanten Untersuchung möchte ich mich mit dem Ausreifungsprozess befassen, den das Metamorphose-Reaktionssystem während der Kaulquappenphase erfährt. Es soll darin gezeigt werden, in welcher Weise sich die morphogenetische Leistungsfähigkeit der thyroxinempfindlichen Körperterritorien mit zunehmendem Larvenalter und Differenzierungszustand verändert.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. Geigy, der mir dieses Thema aus seinem eigenen Arbeitsgebiete überlassen hat, für die Förderung der vorliegenden Untersuchung meinen herzlichen Dank auszusprechen. Zu besonderem Dank fühle ich mich auch verpflichtet gegenüber Herrn Prof. Dr. P. Huber, der mein Manuskript einer kritischen Prüfung unterzogen und mich bei mathematischen Formulierungen in wertvoller Weise beraten hat. Ebenfalls möchte ich danken Herrn Prof. Dr. A. Portmann für sein reges Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, der Firma Hoffmann-La Roche u. Co. A. G. (Basel) für die freundliche Ueberlassung von synthetischem Thyroxin, sowie Herrn Dr. O. Schindler (Gaba A.G., Basel) für die kostenlose Herstellung von Tetramethylthioharnstoff.

ABSCHNITT I

MATERIAL UND METHODIK

1. *Wahl, Beschaffung und Aufzucht des Untersuchungsobjektes.*

Als Untersuchungsobjekt dienten in erster Linie Larven des Grasfrosches, *Rana temporaria* L., zur Abklärung einiger spezieller methodischer Fragestellungen Kaulquappen von *Alytes obstetricans* Laur. Die Larven des Grasfrosches erwiesen sich für die Durchführung der vorliegenden Untersuchung als besonders geeignet: Sie zeigen eine hohe Thyroxinempfindlichkeit, erweisen sich gegenüber experimentellen Eingriffen als sehr widerstandsfähig und sind während einer ausgedehnten Jahreszeit leicht in grosser Zahl zu beschaffen.

Die meist bis in den Frühsommer hinein erfolgte Zustellung von Grasfrosch-Gelegen aus den alpinen Regionen gewährleistete eine ausgedehnte Experimentalsaison. Durch Anwendung der Erfahrungen von Huxley (1929), Taniguchi (1931) und Belkin (1934 *a*, *b*), nach denen Temperaturen von 5—7° C die Amphibienmetamorphose zu blockieren vermögen, gelang es ferner, durch permanente Kältebehandlung der Larven (Eiskastentemperatur 7—8° C) bis in den Winter hinein gesunde Kaulquappen für Versuchszwecke bereitzuhalten.

In Anwendung der Erfahrungen von Gasche (1945) ernährte ich die zur Aufzucht gelangenden Larven mit fein zerriebenem, im Handel erhältlichem Brennesselpulver.

2. *Die Gewinnung des Versuchs-Ausgangsmaterials.*

Für die einzelnen Versuche musste ein statistisch einheitliches Ausgangsmaterial bereitgestellt werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass 1.) alle in einen bestimmten Versuch eingehenden Individuen gleicher Artzugehörigkeit derselben Population entnommen oder aus demselben Laichballen aufgezüchtet wurden, 2.) alle Extreme ausgeschieden wurden. Die statistische Homogenität des Ausgangsmaterials konnte dann anhand einer Längen-Verteilungskurve, die Glockenform zeigen musste, überprüft werden. Die Erfahrung zeigte, dass die einzelnen Individuen eines auf diese Weise gewonnenen Materials im Thyroxin- Versuch quantitativ weitgehend gleichmässig reagieren, ein Verhalten, das von Fischer (1947) bestätigt werden konnte.

Die Larven befanden sich bei Versuchsbeginn stets in gutem Ernährungszustand, was für das Gelingen der Thyroxin-Versuche von Bedeutung sein soll (Roth, 1945). Kaulquappen, die ich in der freien Natur eingefangen hatte, liess ich vor Versuchsbeginn stets einige Tage hungern; anschliessend ernährte ich sie während mehreren Tagen

reichlich mit Brennesselpulver. Dadurch erreichte ich, dass sich auch die aus der freien Natur entstammenden Individuen bei Versuchsbeginn im gleichen Ernährungszustand befanden wie die im Laboratorium aufgezüchteten Larven.

3. *Allgemeine Methodik der Thyroxinversuche.*

Versuchsführung. — Im Prinzip bestand die Versuchsführung darin, Froschlarven von derselben Art, Herkunft und von einheitlichem Entwicklungszustand unter konstanten Versuchsbedingungen verschiedene Thyroxindosen zu verabreichen und die durch die Thyroxinbehandlung provozierten Reaktionsabläufe beobachtend und messend zu verfolgen. Parallel zu den Thyroxin-Versuchen erfolgte jeweils unter denselben Versuchsbedingungen die Durchführung eines Blindversuches. Versuchs- und Kontrolltiere wurden stets in Kristallisierschalen gehalten (Schalen-Versuch), deren Fassungsvermögen zwischen 50 ccm und 1000 ccm variierte. Während den Versuchen wurden die Individuen entweder dauernd ernährt oder die Larven erhielten überhaupt keine Nahrungszufuhr (Thyroxin-Hungerversuch). Die Führung von Kontrolltieren erlaubte es, im Thyroxin-Hungerversuch auftretende Hungereffekte bei der Auswertung der Versuchsergebnisse zu berücksichtigen.

Thyroxinbehandlung. — Die Applikation des Thyroxins erfolgte ausschliesslich in der Form von ruhenden Bädern konstanter Thyroxin-Aussenkonzentration. Diese Form der Thyroxinverabreichung liess sich auf zwei verschiedenen Wegen realisieren:

1. Durch Kurzbehandlung. Die Larven wurden während wenigen Stunden dem Thyroxinbad ausgesetzt, nach Abbruch der Behandlung mit frischem Brunnenwasser abgespült und in eine thyroxinfreie Versuchslösung verbracht (kurzfristiges Thyroxinbad);
2. durch Dauerbehandlung. Die Larven wurden während der gesamten Versuchsdauer bis zu ihrem Eingehen den Thyroxinlösungen exponiert (Thyroxin-Dauerbad).

Während der Behandlungsdauer wurde versucht, die Thyroxin-Aussenkonzentration konstant zu halten. Das Absinken der Thyroxin-Aussenkonzentration, das durch die Thyroxinaufnahme der Larven verursacht wird, kompensierte ich durch periodische Erneuerung der Badeflüssigkeit. Vor Erneuerung der Versuchslösungen erfolgte jeweils eine gründliche Reinigung der Zuchtschalen.

Eine Verminderung der Thyroxin-Aussenkonzentration kann durch eine Inaktivierung resp. Zerstörung von Thyroxin, die in der Badeflüssigkeit erfolgt, gefördert werden. Eine derartige Inaktivierung kann unter dem Einfluss von Stoffen, die von den Larven selbst oder von den in der Badeflüssigkeit enthaltenen Mikroorganismen ausgeschieden werden, zustandekommen. Um zu überprüfen, ob überhaupt und in

welchem Umfang Thyroxin in der Badeflüssigkeit inaktiviert wird, hielt ich ungefähr 20 mittlere Kaulquappen von Alytes obstetricans in ca. 200 ccm Brunnenwasser während 4 Stunden ohne Nahrungszufuhr und filtrierte anschliessend daran die von den Organismen abgetrennte Badeflüssigkeit. Das klare Filtrat, das nur eine schwache Grünfärbung zeigte [1], wurde mit einigen Tropfen NaOH versetzt, bis es schwach alkalisch reagierte (pH = 9,0). Durch Auflösen von 4,08 mg kristallisiertem d,l-Thyroxin in 1 ccm 0,1 n-NaOH und durch Verdünnung mit 40 ccm Filtrat erhielt ich eine stabile 9,96 mgr.%-ige Thyroxinlösung,

Tabelle I.

Versuch über die Inaktivierung des Thyroxins.

Zeit seit Versuchsbeginn in Stunden	Thyroxinkonzentration der mit Badeflüssigkeit hergestellten Thyr-Lösung in mgr-%	
	berechnet	kolorimetrisch bestimmt
0	9,96	10,02
1	—	10,01
2	—	10,04
3	—	10,03
4	—	10,06
5	—	9,96

welche die für die Inaktivierung in Frage kommenden Stoffe enthielt. In Zeitabständen von je einer Stunde wurde die Thyroxinkonzentration dieser Lösung mit Hilfe eines speziell für solche Zwecke ausgearbeiteten Analysenverfahrens (Moser, 1947) kolorimetrisch bestimmt [2].

Würde nun unter dem Einfluss der in der Badeflüssigkeit resp. in deren Filtrat enthaltenen Stoffe Thyroxin zerstört, so müsste die Thyroxinkonzentration der mit Badeflüssigkeit hergestellten Lösung mit zunehmender Versuchszeit stetig abnehmen.

Aus Tabelle I geht hervor, dass die Thyroxinkonzentration innerhalb der Fehlerbreite (± 2%) der Bestimmungsmethode konstant bleibt. Wir schliessen daraus, dass die in der Badeflüssigkeit erfolgende Inaktivierung von Thyroxin während den ersten fünf Behandlungsstunden entweder gleich Null oder aber sicher so gering ist, dass sie vernachlässigt werden kann.

[1] Um eine starke Verunreinigung der Badeflüssigkeit durch Kotabsonderung zu vermeiden, wurden die Kaulquappen vor Versuchsbeginn einige Tage hungernd gehalten.

[2] Die kolorimetrische Bestimmung des Thyroxins erfolgte unter Umgehung der sich schwierig gestaltenden und nur ungenaue Resultate liefernden Extraktion mit Butanol direkt an der zu untersuchenden Lösung. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die in der Lösung vorhandenen Fremdstoffe die Farbreaktion des Thyroxins nur unwesentlich stören.

Die Angabe der in den verschiedenen Thyroxin-Versuchen angewandten Konzentrationen geschieht jeweils in der Form der Proportion 1 : X, d. h. 1 Gewichtsteil Thyroxin ad X Gewichtsteile Lösungsmittel, oder in γ-%, d.h. in γ[1] Thyroxin ad 100 ccm Lösungsmittel. Zur Herstellung der Thyroxinlösung standen mir Ampullen der Firma Hoffmann-La Roche A. G., Basel, zur Verfügung. Diese Ampullen enthalten eine 1‰-ige alkalische Lösung von synthetischem d,l - Thyroxin. Durch Verdünnen dieser Ampullenlösungen 1 : 1000 mit Brunnenwasser (pH = 7,02) konnten stabile Thyroxinlösungen bis zu Konzentrationen von ungefähr 1 : 200'000 erzeugt werden, die sich auch bei einer Verschiebung des pH in den schwach sauren Bereich hinein als haltbar erwiesen. Bei der Herstellung stärkerer Thyroxinkonzentrationen als ungefähr 1 : 200'000 wurde die Verdünnung der Ampullenlösung mit schwach alkalischem Wasser vorgenommen. Um ein Ausfallen des Thyroxins in derart hochkonzentrierten Lösungen zu verhindern, musste das pH dauernd auf einem Wert von 8 bis 10 gehalten werden. Die in dieser Untersuchung angewandten Thyroxinkonzentrationen variierten zwischen der im Kaulquappen-Versuch hochwirksamen Dosis 1 : 500'000 (= 200 γ-%) und der nur noch geringe Wirkungen entfaltenden Konzentration 1 : 300'000'000 (= 0,33 γ-%). Stärkere Thyroxinkonzentrationen als 1 : 200'000 (= 500 γ-%) kamen — abgesehen von der durch sie bewirkten Ueberdosierung — infolge ihrer Instabilität in Versuchslösungen, die Kaulquappen enthalten, in unseren Versuchen nicht in Frage. Es zeigte sich nämlich im Verlaufe dieser Untersuchung, dass in anfänglich klaren und stabilen Thyroxinlösungen der Konzentration 1 : 10'000 (pH = 9,0), in die mehrere Kaulquappen von *Alytes obstetricans* verbracht wurden, das Thyroxin jeweils schon nach ungefähr 15—20 min. Behandlungszeit in der Form eines milchig-weissen Niederschlages mikrokristallin auszufallen begann. Ich konnte mir diese Erscheinung nicht anders erklären, als dass Kaulquappen, die schwach NaOH-alkalischen Versuchslösungen exponiert werden, durch Ausscheidung einer Säure die Wasserstoffjonenzahl der Badeflüssigkeit herabzusetzen vermögen. Um diesen Vorgang genauer festzuhalten, wurden 20 mittlere *Alytes*-Kaulquappen in 150 ccm schwach NaOH-alkalische, thyroxinfreie Versuchslösung (pH = 9,5) verbracht und in periodischen Zeitabständen die Wasserstoffjonenzahl der Badeflüssigkeit mit Hilfe der Indikatorenmethode bestimmt. Wie ich feststellen konnte nimmt das pH während den ersten 15 min von 9,5 bis 8,5 fast linear ab, um sich dann, sprunghaft von 8,5 auf 6,0 abfallend, in den nächsten 5 min. in den sauren pH-Bereich zu verschieben. Der pH-Wert 6,0 bleibt während der weiteren Versuchszeit (3,7 Stunden) konstant (siehe Fig. 1). Dieses Verhalten erwies sich in mehreren Versuchen als ein streng reproduzierbares. Wichtig erscheint mir in diesem Zusammenhang nicht die Interpretation dieses Phänomens, sondern vielmehr seine praktische Bedeutung für die Verwendbarkeit hochkonzentrierter Thyroxinlösungen

[1] 1 γ = 10—6 gr.

im Kaulquappen-Versuch. Da sich einerseits Thyroxinkonzentrationen $c_a \geq 1 : 200'000$ nur in schwach alkalischen Lösungen als stabil erweisen, da andererseits aber Kaulquappen das pH der dargebotenen schwach alkalischen Versuchslösungen nach wenigen Minuten in den sauren pH-Bereich verschieben, so wird das Thyroxin in hochkonzentrierten Badeflüssigkeiten schon nach kurzer Behandlungszeit auszufallen beginnen. An sich stabile Thyroxinlösungen, deren

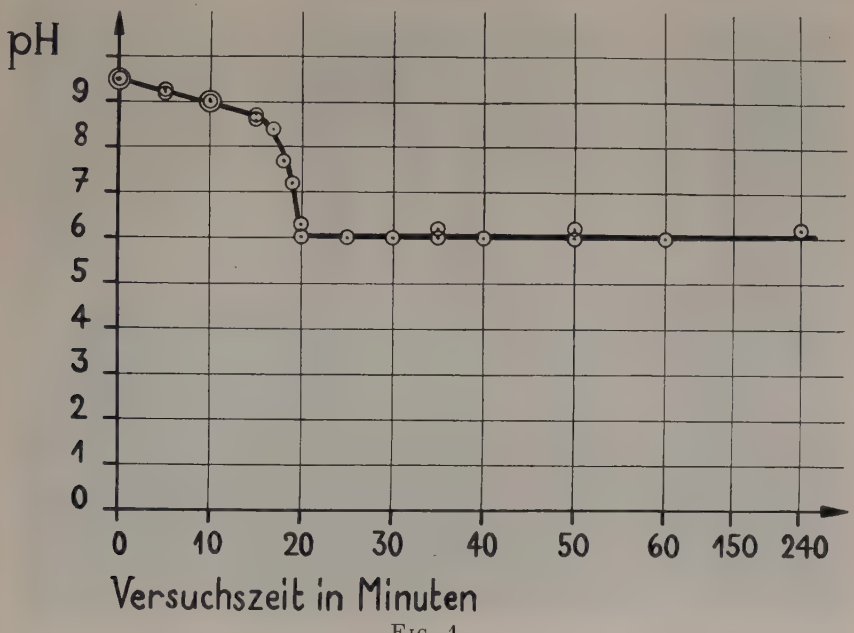


FIG. 1.

Die durch Kaulquappen (*Alytes obstetricans* Laur.) verursachten Aenderungen des pH der Badeflüssigkeit.

Konzentration stärker als ungefähr 1 : 200'000 ist, erweisen sich demnach im Kaulquappen-Versuch als unbeständig; ihre Verwendung ist infolgedessen im quantitativen Thyroxin-Versuch zu vermeiden[1].

[1] Von verschiedenen Autoren sind Angaben bekannt, nach denen Thyroxinkonzentrationen $c_a \geq 1 : 200'000$ im Kaulquappen-Versuch verwendet wurden (FONTÈS und ARON, 1929, sowie ALPHONSE und BAUMANN, 1935: $c_a = 1 : 50'000 = 2000\ \gamma$-%), ohne dass die Erscheinung der pH-Verschiebung in der Badeflüssigkeit der Kaulquappen bemerkt resp. berücksichtigt (z. B. durch Pufferung der Versuchslösungen) worden wäre. Es ist daher anzunehmen, dass in den von diesen Autoren durchgeführten Experimenten infolge Ausfällung nur ein bestimmter Bruchteil des äusserlich applizierten Thyroxins in gelöster, d. h. penetrationsfähiger Form auf die Larven einzuwirken vermochte.

Die Konstanz der Versuchsbedingungen. Unter der Vielzahl der exogenen Faktoren, die den Ablauf der Thyroxin-Versuche zu beeinflussen vermögen, erweisen sich Temperatur, Individuen-Raumdichte (d. h. die Anzahl gleichwertiger Individuen pro Volumeneinheit Badeflüssigkeit), Ernährung und stoffliche Zusammensetzung der verabreichten Versuchslösungen als besonders wirksam. Um eindeutige und reproduzierbare Resultate zu erhalten, bemühte ich mich stets

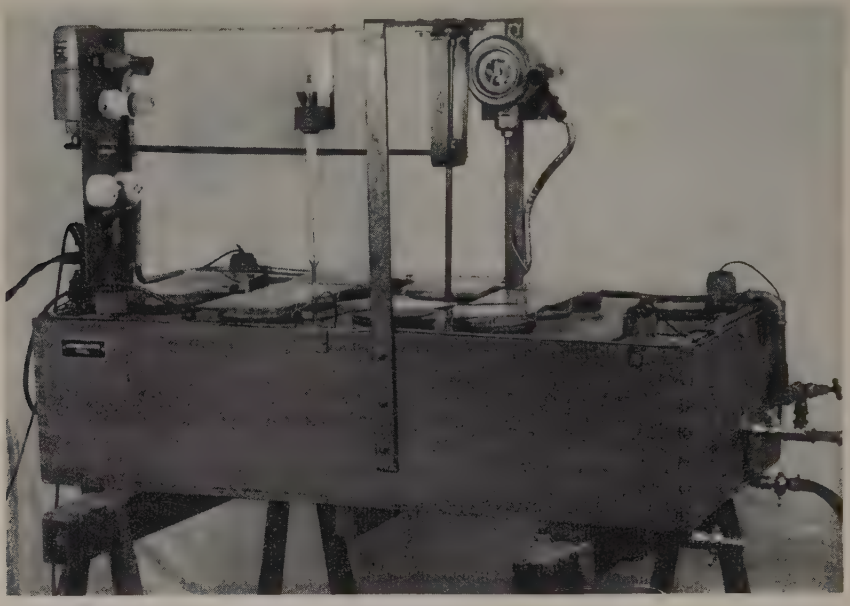


Fig. 2.
Wasserbad-Thermostat für entwicklungsphysiologische Untersuchungen an aquatilen Tieren.

darum, während des Versuchsablaufes grösstmögliche Konstanz der Versuchsbedingungen zu erzielen. Zur Einhaltung der Temperaturkonstanz fanden zu Beginn dieser Untersuchung Raumthermostaten Verwendung, die eine Temperaturkonstanz von $\pm$ 0,5° C (maximale Abweichung) zu erzeugen vermochten. Später gelangte ein nach eigenen Plänen konstruierter Wasserbadthermostat für entwicklungsphysiologische Untersuchungen an aquatilen Tieren zur Anwendung (siehe Fig. 2, 3). Dieser setzt sich aus einem Wasserbadbassin WB von 100 Litern Fassungsvermögen und einem maximalen Wasserstand von 20 cm, einer Kühlanlage K, einer elektrischen Heizvorrichtung H für das Wasserbad, einem Thermoregulator TR und einem Rührwerk R zusammen. Die Kühlung des Wasserbades erfolgt durch einen konstanten Zustrom von Kühlwasser in die Kühlanlage. Zustrom und Abfluss des

Kühlwassers sind derart geregelt, dass die Kühlanlage K dauernd prall mit Wasser gefüllt ist. Das Rührwerk wird durch einen Elektromotor für Dauerbetrieb (N = 0,025 PS) angetrieben und arbeitet absolut zuverlässig während eines ganzen Monats. Durch Inbetriebsetzung der Kühlanlage, der Heiz- und der Regulationsvorrichtungen des Wasserbades gelingt es, selbst bei hochsommerlichen Laboratoriumstemperaturen von 26° C, konstante Wasserbadtemperaturen von 18° C zu erzeugen. Die stets mit Glasplatten gedeckten und in das Wasserbad eingetauchten Zuchtschalen nehmen die Temperatur des umgebenden Wasserbades mit hinreichender Genauigkeit an. Mit Hilfe dieser Appara-

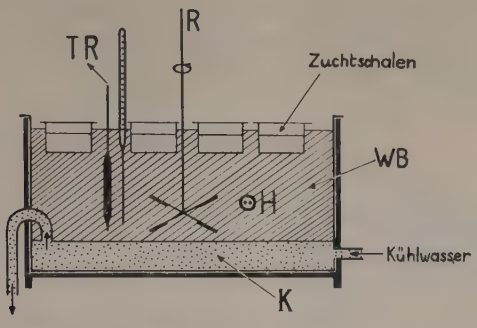


Fig. 3.
Schema des Wasserbadthermostaten.

tur kann eine Temperaturkonstanz von ± 0,3° C (maximale Abweichung) erreicht werden.

Während die Konstanthaltung der Individuen-Raumdichte und der chemischen Zusammensetzung des Badewassers eine leicht durchführbare ist, stellen sich der Konstanthaltung der Ernährungsbedingungen im Thyroxin-Versuch erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Die durch das Thyroxin ausgelösten Umwandlungen der Mund- und Darmstruktur bewirken eine Sistierung der Nahrungsaufnahme bei den Versuchstieren, während die Kontrollen die dargebotene Nahrung weiterhin aufzunehmen imstande sind. Diese Schwierigkeiten in der Konstanthaltung der Ernährungsbedingungen bei Versuchs- und Kontrolltieren lassen sich überwinden, wenn die Versuchs- und Kontrolltiere während des Versuchs überhaupt keine äussere Nahrungszufuhr erhalten (Thyroxin-Hunger-Versuch, siehe Allen, 1932) und sich allein von ihren autochthonen Nahrungsreserven erhalten müssen.

Die Hemmung autochthoner Schilddrüsenwirkungen. Etkin (1935) konnte nachweisen, dass die eigene Schilddrüse junger Kaulquappen (Prämetamorphose-Stadien) keinen oder zumindest nur einen unbedeutenden Einfluss auf den Ablauf der Thyroxinmetamorphose ausübt. Das äusserlich applizierte Thyroxin fördert die Aktivität der Schilddrüse nicht; die Thyreoidea zeigt nach Thyroxin-

behandlung vielmehr das Bild der Hypofunktion. Verwendet man hingegen ältere Kaulquappen (Prometamorphose-Stadien), so macht sich der Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität auf den Ablauf der Thyroxin-Versuche deutlich bemerkbar. Diese Befunde mussten bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt werden. In Thyroxinversuchen, in denen neben jungen und mittleren Kaulquappen auch ältere Larvenstadien zur Untersuchung gelangten, wurde die autochthone Schilddrüsentätigkeit durch Behandlung der Versuchs- und Kontrolltiere mit schilddrüsenhemmenden Stoffen (Astwood, 1943; Hughes und Astwood, 1944; Gasche, 1946 *a*, *b*) ausgeschaltet, resp. in hinreichendem Masse gehemmt. Dieser Weg ermöglichte es uns, die bei *Rana*-Larven ziemlich schwierig durchzuführende, vor allem aber zeitraubende und nicht in allen Fällen erfolgreiche Thyroidektomie zu umgehen.

4. *Die Messtechnik.*

Um den Ablauf der Thyroxinmetamorphose der biometrischen Analyse zugänglich zu machen, mussten für eine Reihe von Körperteilen und Körperabschnitten charakteristische Messgrössen ausgewählt und festgelegt werden. Bei der Auswahl der Messgrössen wurden diejenigen bevorzugt, die während der Metamorphose besonders intensiven Variationen unterworfen sind und für deren Abgrenzung leicht erfassbare Fixpunkte zur Verfügung stehen. Die Definition der Lage der Fix- und Messpunkte erfolgt in Fig. 4 *a*-4 *e* sowie in der Beschreibung der ausgewählten Messtrecken.

Beschreibung der Messtrecken. — Strecken, die in lateraler Objektlage zur Ausmessung gelangen, sind mit „L" bezeichnet; entsprechend werden die in ventraler Objektlage zur Bestimmung gelangenden Strecken mit dem Symbol „V" versehen.

(L 1): Körperlänge. Distanz zwischen Kopfspitze und Schwanzspitze auf der Körperlängsachse. (Fig. 4a)

(L 2): Kopf-Rumpflänge. Parallel zur Körperlängsachse gemessene Distanz zwischen Kopfspitze und ventralem Ansatz des Schwanzstammes am Rumpf. (Fig. 4a)

(L 3): Hinterextremitätenlänge. Länge der Hinterextremität oder von deren Anlage, gemessen von ihrem Ursprung bis zu ihrer distalsten Zehenspitze resp. Abrundung in parallel zum Ruderschwanz ausgestrecktem Zustand. (Fig. 4a)

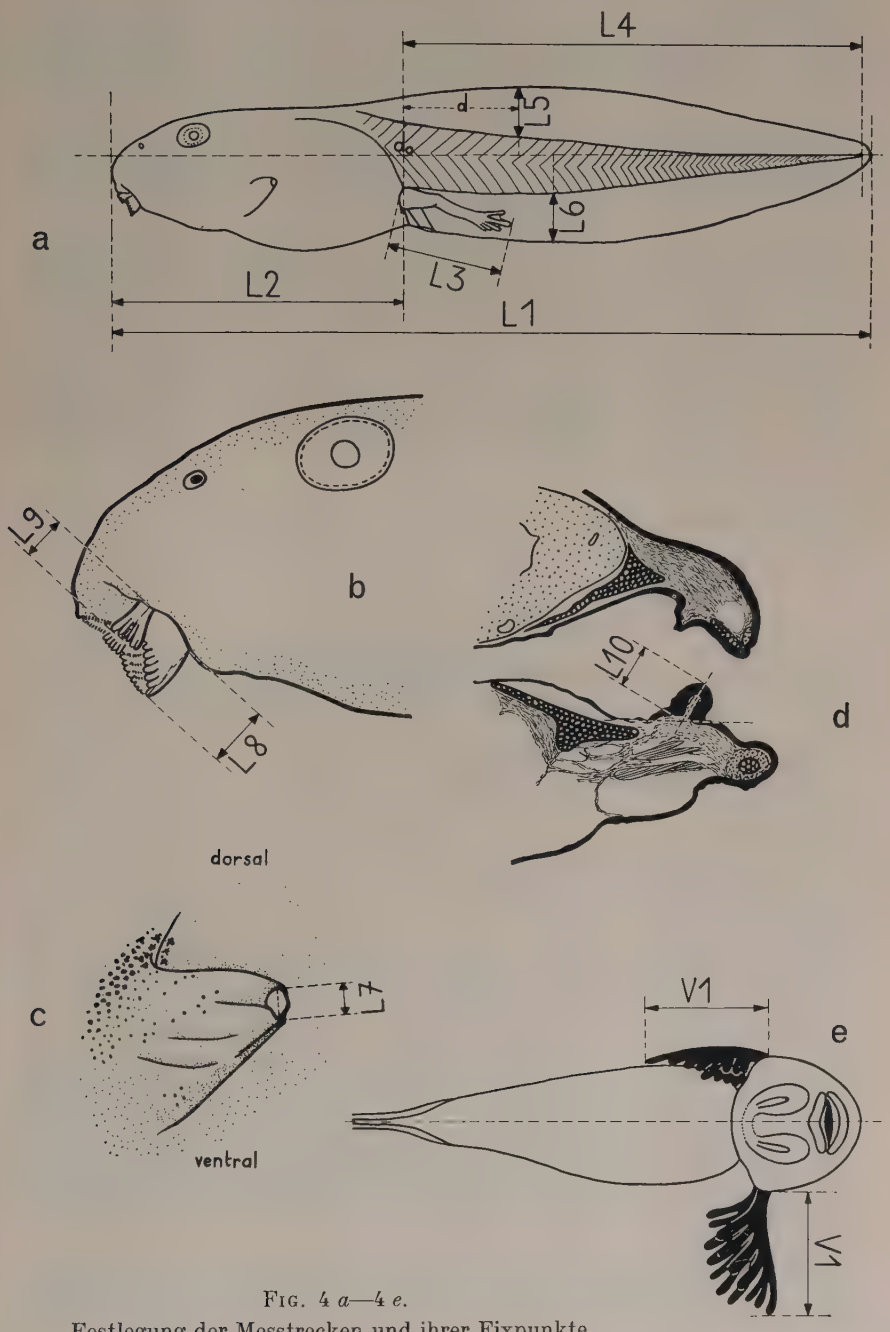


FIG. 4 *a*—4 *e*.
Festlegung der Messtrecken und ihrer Fixpunkte.

(L 4): Schwanzstammlänge. Länge der zentralen Schwanzpartie von der Spitze des Schwanzstammes bis zu seinem ventralen Ansatz am Rumpf. (Fig. 4a)

(L 5): Dorsale Flossensaumhöhe. Höhe des dorsalen Flossensaumes in jeweils definierten Abständen d_1, d_2, d_3 ..., d_n auf der Körperlängsachse. (Fig. 4a)

(L 6): Ventrale Flossensaumhöhe. Höhe des ventralen Flossensaumes, definiert entsprechend Mestrecke L 5. (Fig. 4a)

(L 7): Durchmesser der Operkularöffnung. Maximaler Durchmesser der linksseitigen Operkularöffnung (Linksseitigkeit bezogen auf Dorsalansicht des Objektes). (Fig. 4c)

(L 8): Mediane Unterlippendistanz. Abstand zwischen medianer Ansatzstelle der Unterlippe am Körper und medianer Abgrenzung des Lippensaumes oder von dessen Anlage. (Fig. 4b)

(L 9): Laterale Unterlippendistanz. Abstand zwischen dem Ansatz der die Mundwinkel umrahmenden Partie der Unterlippe am Körper und ihrer distalsten Begrenzung. (Fig. 4b)

(L 10): Zungendistanz. Länge der Zunge oder von deren Anlage, gemessen von der Basis bis zu ihrer äussersten Begrenzung. (Fig. 4d)

(V 1): Länge der äusseren Kieme: Abstand der äussersten Kiemenspitze des ersten Kiemenästchens von der Wurzel des Kiemenstammes. (Fig. 4e)

Die Ausführung der Messungen. — Die Messungen erfolgten fast ausschliesslich am lebenden, narkotisierten Objekt. Als Narkotikum diente eine wässrige Lösung von M. S. 222-Sandoz [1], deren Konzentration je nach Alter und Empfindlichkeit der Larven zwischen 1 : 5000 und 1 : 10'000 variierte und die nie länger als 15 bis 30 min. zur Einwirkung gelangte. Die Bestimmung der Zungendistanz (Mes-

[1] Das von der Firma Sandoz A. G., Basel, hergestellte M. S. 222 ist ein gut wasserlösliches Narkotikum für poikilotherme, aquatile Wirbeltiere (Rothlin, 1932); chemisch ist es ein Isomeres des Anästhesins.

strecke L 10) und der Länge der äusseren Kieme (Messtrecke V 1)[1] konnte nur nach erfolgter Sektion der Larven, d. h. in totem Zustand ausgeführt werden. In denjenigen Fällen, in denen ich gezwungen war, tote Larven zur biometrischen Analyse zu verwenden, gelangten stets solche Objekte zur Ausmessung, die in Bouin' scher Flüssigkeit fixiert und anschliessend in 75%-igem Alkohol konserviert wurden. Die Veränderungen, die die Messtrecken unter dem Einfluss der fixierenden und konservierenden Stoffe erlitten haben, können daher als weitgehend konstant angenommen werden. Die Angaben, die sich auf die vereinzelt durchgeführten Messungen an toten Individuen beziehen, werden im Verlauf dieser Untersuchung jeweils durch besondere Anmerkungen gekennzeichnet.

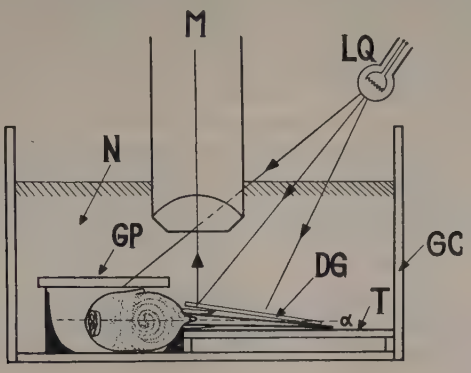


Fig. 5.
Anordnung zur Durchführung mikroskopischer Messungen am lebenden Objekt (laterale Objektlage).

Je nach der Grösse der zu untersuchenden Organe und Körperteile erfolgten die Messungen direkt mit Hilfe eines kleinen Masstabes oder indirekt unter Zuhilfenahme eines Leitz-Mikroskopes mit Mikrometerokular und verschiebbarem Objekttisch sowie einer auf den Objekttisch passenden Messcuvette aus Glas. Um grössere Messfehler vermeiden zu können, musste stets darauf geachtet werden, dass das zur Ausmessung bestimmte Objekt in voll ausgestrecktem Zustand die charakteristische Lateral- oder Ventrallage in der Messcuvette oder auf dem Messtisch einnahm. Die in Fig. 5 schematisch dargestellte Anordnung ermöglichte genaue mikroskopische Messungen in lateraler Objektlage. Beim Arbeiten mit lebendem Material wird die auf den verschiebbaren Objekttisch des Mikroskops (M) passende Glascuvette (GC) mit dem Narkotikum (N), beim Arbeiten mit konserviertem Material mit

[1] Während der Umwandlung der Junglarve in die Jungkaulquappe werden die in Abbau begriffenen äusseren Kiemen von der Operkularfalte überwachsen, sodass ihre Ausmessung erst nach erfolgter Sektion durchgeführt werden kann.

75%-igem Alkohol aufgefüllt. In der Messcuvette ist ein etwa die Hälfte der Bodenfläche einnehmender und ca. 1—3 mm hoher Glastisch (T) angebracht. Das Objekt wird in lateraler Lage derart in der Messcuvette plaziert, dass die Kopf-Rumpfpartie den Boden berührt, der Ruderschwanz eben ausgestreckt auf die Tischplatte (T) zu liegen kommt und die Körperlängsachse (α) möglichst parallel zum Cuvettenboden verläuft. Die Fixierung der lateralen Objektlage gelingt durch Beschwerung des Ruderschwanzes und der parallel zu diesem ausgestreckten Hinterextremität mit einem Deckglas (DG) oder je nach den Verhältnissen mit einem etwas massiveren Glasplättchen. Das störende Aufsteigen der Kopf-Rumpfpartie, das durch die Anwesenheit grösserer Mengen von Atmungsluft im Pharynx und Peribranchialraum der narkotisierten Larven verursacht wird, lässt sich durch eine Glasplatte (GP) verhindern, die in Rumpfhöhe derart über dem Objekt angebracht wird, dass sie keinen Druck auf dieses ausübt. Die Einstellung und Ausmessung der einzelnen Strecken erfolgt im Auflicht, das durch eine starke Lichtquelle (LQ) erzeugt wird. Eine entsprechende Anordnung verwendete ich für die mikroskopischen Messungen in ventraler Objektlage.

Die statistische Auswertung des Zahlenmaterials. Zur statistischen Bearbeitung des Zahlenmaterials fand das für den Praktiker gegeignete Werk von Linder (1945) Verwendung. Zur Bestimmung der Mittelwerte standen meist 5, selten 10 Einzelwerte zur Verfügung. Die Erfahrung zeigte, dass die fortschreitende Ausmessung derselben 5 Individuen, die einem statistisch einheitlichen Ausgangsmaterial entstammen, schon recht brauchbare Durchschnittswerte zu liefern vermag.

5. *Die histologische Technik.*

Die Fixierung der Larven erfolgte stets total im Bouin'schen Fixierungsgemisch. Die in 75%-igem Alkohol konservierten Objekte wurden nach der Methode von Peterfi und Romeis über absoluten Alkohol, Methylbenzoat-Celloidin und Benzol in Paraffin vom Schmelzpunkt 55-66° C eingebettet. Als Schnittdicke wählte ich stets 7 μ. Unter den verwendeten Farblösungen bewährte sich besonders das Heidenhain'sche Hämatoxylin allein oder in Kombination mit Eosin, sowie die Methylblau/Eosin-Kombination nach Mann.

ABSCHNITT II

ABLAUF UND INDUKTION DER THYROXINMETAMORPHOSE

1. *Der Metamorphoseablauf und seine biometrische Analyse.*

Die Anurenmetamorphose stellt eine Gesamtheit von Abbau-, Neuentwicklungs- und Weiterentwicklungsprozessen dar (Geigy, 1941 *b*; Geigy und Portmann, 1941), die zu verschiedenen Zeiten einsetzen und mit abgestufter Geschwindigkeit erfolgen. Nach Etkin (1932) lassen sich bei Anuren zwei charakteristische Phasen des Metamorphosenablaufs voneinander unterscheiden:

1. Die Prometamorphosephase, die durch das rapide Wachstum der Hinterextremitäten und der Schilddrüse, durch die Veränderungen der Hautpigmentierung, sowie durch eine Verminderung des Wassergehaltes der Gewebe ausgezeichnet ist.
2. Die Phase des Metamorphose-Klimax (Metamorphose-Krisis), die die Gesamtheit der intensiv verlaufenden Abbau- und Umgestaltungsprozesse an den Mundteilen, dem inneren Kiemenapparat, dem Spiraldarm, dem Ruderschwanz etc. umfasst, die ferner durch eine weitere Intensivierung der Dehydratation der Körpergewebe, sowie durch die zunehmende Verlangsamung des Hinterextremitäten- und des Schildrüsenwachstums gekennzeichnet ist.

Die Umwandlung der Kaulquappe in einen lebensfähigen Jungfrosch kann nur dann gelingen, wenn die Metamorphose-Teilprozesse zeitlich aufeinander abgestimmt sind. So darf beispielsweise der Abbau des inneren Kiemenapparates erst dann einsetzen, wenn die Lungen ihre volle Ausbildung erfahren haben und als solche die Funktion der verschwindenden Kiemen übernehmen können. In der normalen Anurenmetamorphose erfolgen daher die einzelnen Metamorphose-Ereignisse in einer ganz bestimmten Folge, die das Zustandekommen eines lebensfähigen Jungfrosches gewährleistet. Schreiber (1934) bezeichnet diese spezifische Sukzession als morphogenetische Serie („serie morfogenetiche"), Etkin (1935) charakterisiert sie als Metamorphose-Mus-

ter („metamorphic pattern"). Die Reihenfolge, in der die verschiedenen Metamorphose-Reaktionen einsetzen, wollen wir als Metamorphose-Reaktionsmuster kennzeichnen. Das Reaktionsmuster stellt einen Spezialfall der morphogenetischen Serie dar, da letztere nicht nur den regionalen Metamorphose-Start, sondern beliebige Metamorphose-Episoden umfasst.

Die für das Normalgeschehen spezifische Sukzession der Metamorphose-Episoden wird in der experimentell erzwungenen Umwandlung dann angenähert eingehalten, wenn die Versuchstiere in Bädern gehalten werden, deren Thyroxinkonzentration mit fortschreitendem Reaktionsablauf stufenweise erhöht wird, niemals dann aber, wenn die Larven unter den Einfluss konstanter Thyroxin-Aussenkonzentrationen gelangen (Etkin, 1935). Bei Dauereinwirkung stärkerer Thyroxin-Aussenkonzentrationen treten die für den Metamorphose-Klimax charakteristischen Ereignisse schon kurze Zeit nach Behandlungsbeginn ein; demgegenüber werden die übrigen Metamorphose-Vorgänge nicht in entsprechendem Masse beschleunigt, sodass in der Folge jene „Stauchfröschchen" mit unterentwickelten Extremitäten, klaffendem Mund und übertriebenem Exophthalmus entstehen, die rasch an den erlittenen Entwicklungsstörungen (Geigy, 1941 *a*) und an Sauerstoffmangel (Jarisch, 1920) zugrundegehen. Diese Disharmonien des experimentell erzwungenen Metamorphoseablaufs sind nach Schreiber (1934) darauf zurückzuführen, dass bei massiver Schilddrüseneinwirkung sowohl die thyroxinempfindlichsten als auch die thyroxinunempfindlicheren Körperterritorien praktisch miteinander zur maximalen Reaktionsleistung veranlasst werden, ganz im Gegensatz zum Normalgeschehen, wo die immer stärker sezernierende Schilddrüse die verschieden thyroxinempfindlichen Körperbereiche nacheinander zu voller Aktivität aufruft.

Unsere erste Aufgabe besteht darin, die unter dem Einfluss des Thyroxins zustandekommenden Metamorphose-Teilvorgänge einer quantitativen Analyse zu unterziehen. Wir beschränken uns dabei auf diejenigen Organreaktionen, die für unsere späteren Betrachtungen von Bedeutung sind.

Das Verhalten der Hinterextremitätenanlagen. Während die Extremitäten der Urodelenlarve durch das Schilddrüsenhormon nicht beeinflussbar sind (Uhlenhuth, 1921), zeigen die Extrmitätenanlagen der Anurenlarve eine hohe

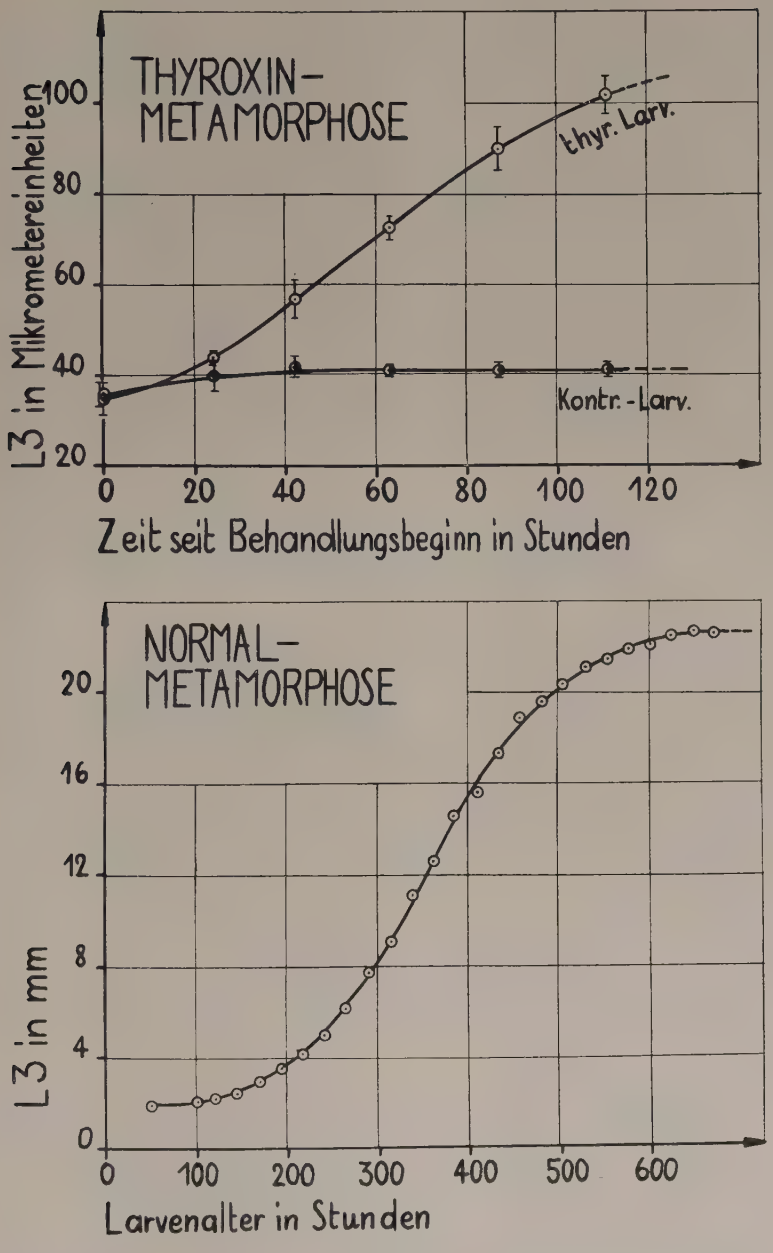


FIG. 6.

Rana temporaria. Das beschleunigte Wachstum der Hinterextremitäten während der Thyroxin- und Normalmetamorphose (L 3 = Hinterextremitätenlänge).

Thyroxinempfindlichkeit (Champy, 1922 *a*, *b*; Romeis, 1923/24; Allen, 1932; Etkin, 1935; Geigy, 1941 *a* u.a.). Die in den Körper der Kaulquappe eindringenden Schilddrüsenstoffe verursachen eine deutlich erkennbare Beschleunigung des Wachstums und der Differenzierung der Extremitätenknospen. Entsprechend hat bei den Anuren die Ausschaltung der autochthonen Schilddrüsenaktivität durch frühzeitig erfolgende Thyroidektomie (Allen, 1918; Hoskins E. R. und M. M., 1917; Etkin, 1935) oder durch frühzeitig einsetzende Dauerbehandlung mit schilddrüsenhemmenden Stoffen von einem bestimmten Larvenalter an eine deutliche Verzögerung der Extremitätenentwicklung zur Folge (Allen, 1918). Der obere Teil von Fig. 6 veranschaulicht den für die Thyroxinmetamorphose charakteristischen Verlauf des Längenwachstums der Hinterextremitätenanlagen. Die Kurvenpunkte stellen stets Mittelwerte dar, die durch fortlaufende Ausmessung von fünf Individuen, die im Stadium der jüngeren Kaulquappe mit Hinterbein-Zäpfchen zur Thyroxinbehandlung gelangten, gewonnen wurden. Da die Streuung der individuellen Messwerte für Versuchs- und Kontrolltiere durchschnittlich nur $\pm$ 5,3% des Mittelwertes ausmacht, folgt die Mittelwertkurve weitgehend der Längenwachstumskurve des einzelnen Individuums. Wie aus der Darstellung hervorgeht, beginnt sich der Einfluss der Thyroxinbehandlung an den Hinterextremitätenanlagen erst nach Ablauf des ersten Behandlungstages deutlich erkennbar auszuwirken. Zwischen dem zweiten und dem dritten Versuchstag erreicht die Wachstumsgeschwindigkeit bei den thyreotischen Larven ihr Maximum, um dann mit weiterhin fortschreitender Versuchszeit wieder etwas abzunehmen. Da die Larven während des Versuches keine Nahrungszufuhr erhielten (Thyroxin-Hungerversuch), zeigt die Längenwachstumskurve der Kontrolltiere einen ausgesprochen flachen Verlauf; schon am zweiten Versuchstag stellt sich Wachstumsstillstand ein.

Zu Vergleichszwecken ist im unteren Abschnitt der Darstellung die Längenwachstumskurve einer einzelnen, normal metamorphosierenden Kaulquappe von *Rana temporaria* dargestellt. Der Nullpunkt der Zeit- oder Altersskala entspricht jenem Larvenalter, von dem ab es noch genau 18 Tage dauert, bis die erste Vorderextremität durch das Perforationsloch „durchbricht". Entsprechend wie bei den von Etkin (1932) untersuchten amerikanischen Frosch-

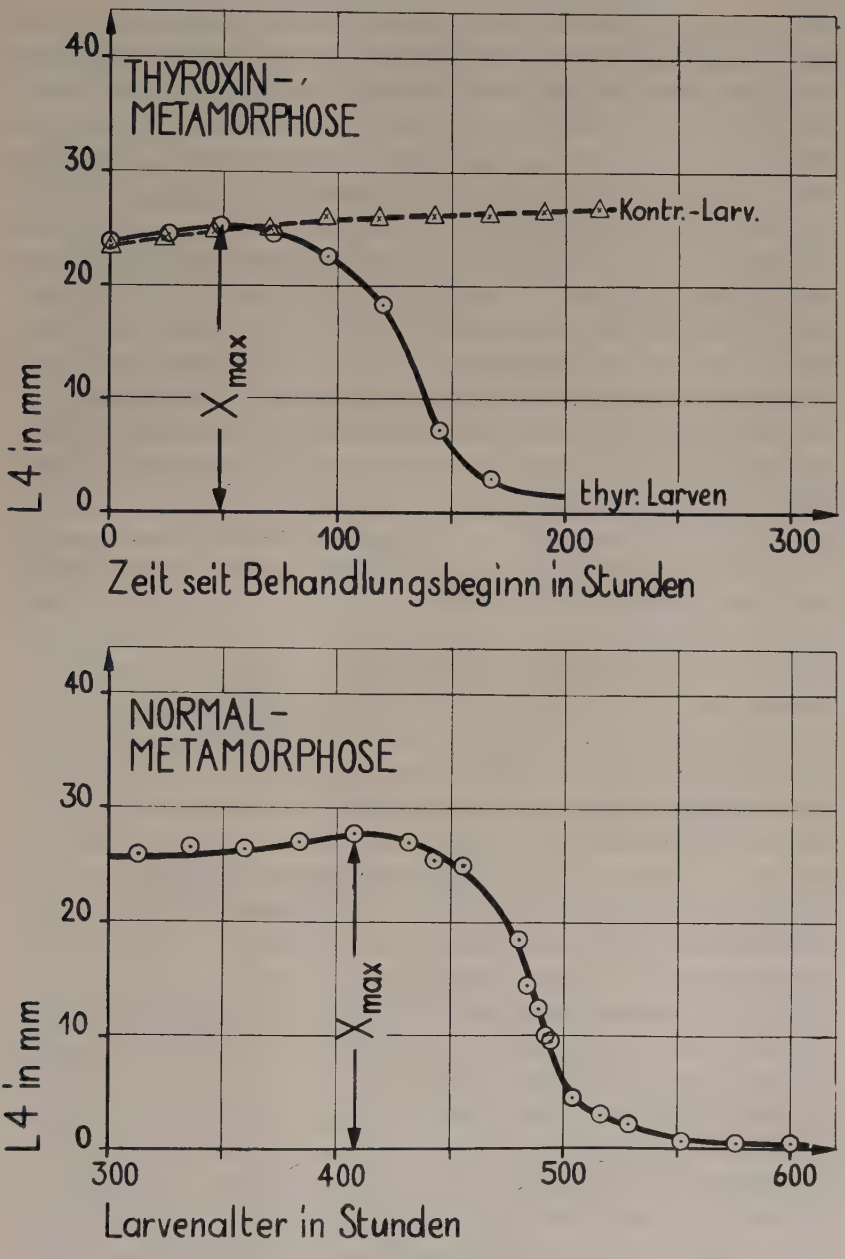


FIG. 7.

Rana temporaria. Reduktion der zentralen Schwanzpartie während der Thyroxin- und Normalmetamorphose (L 4 = Schwanzstammlänge).

·arten finden wir bei *Rana temporaria* L. eine S-förmige Längenwachstumskurve der Hinterextremität. Während der relativ ausgedehnten Kaulquappenphase (Prämetamorphose) erfolgen Extremitätenwachstum und -differenzierung nur sehr langsam. Zu Beginn der Prometamorphose aber, offenbar im Zusammenhang mit der zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Steigerung der Hypophysen- und Schilddrüsenaktivität, erfahren Hinter- und Vorderextremitätenwachstum eine eminente Beschleunigung („prometamorphic hind leg growth" nach Etkin, 1932-1935). Die Wachstumsgeschwindigkeit erreicht rasch ein Maximum, um dann mit weiterhin zunehmender Entwicklungszeit langsam gegen Null abzusinken. Nach Abschluss der Metamorphose sind die zu Sprungbeinen ausgebildeten Hinterextremitäten wiederum durch ein relativ langsam erfolgendes Längenwachstum gekennzeichnet, entsprechend wie ihre Anlage während der Prämetamorphose.

Das Verhalten des Ruderschwanzes. Der Kaulquappenschwanz gliedert sich in die zentrale Schwanzpartie (kurz als Schwanzstamm bezeichnet) und in den dorsalen und den ventralen Flossensaum. Die nach Verabreichung von Schilddrüsenstoffen am Ruderschwanz der Anurenlarve auftretenden makroskopischen Veränderungen schildert Romeis (1916-1924). Darnach kommt es bei starker Verfütterung von Schilddrüsenstoffen an mittlere und jüngere Kaulquappen zu einer überstürzten Einschmelzung des Ruderschwanzes. Dieser fallen in besonders starkem Masse die Flossensäume anheim, während die Resorption der zentralen Schwanzpartie mit geringerer Intensität erfolgt. Die bald eingehenden Endstadien weisen daher im allgemeinen einen kahlen Muskelstummel auf, „dessen Länge noch die Hälfte oder ein Drittel der ursprünglichen Schwanzlänge beträgt" und deren Spitze durch starke Pigmentierung ausgezeichnet ist. Der obere Teil von Fig. 7 veranschaulicht den Verlauf der durch Thyroxinbehandlung bei älteren Kaulquappen erzwungenen Schwanzstamm-Reduktion, erfasst durch fortlaufende Ausmessung der Schwanzstammlänge (Messtrecke L 4). Die Kurvenpunkte stellen wiederum Mittelwerte von Einzelmessungen dar, die anhand von fünf Individuen gewonnen worden sind. Da die auftretende Streuung der Schwanzstammlänge den Abmessungen der Signatur der Kurvenpunkte entspricht (mittlere Streuung $s = \pm 3\%$ des Mittelwertes), wurde auf ihre Eintragung in das Kurvenbild verzichtet. Bei den

Versuchstieren, die unter dem Einfluss des Thyroxins stehen, nimmt die Schwanzstammlänge nach Behandlungsbeginn noch etwas zu, um nach Ablauf des zweiten Versuchstages ihren Maximalwert X_{max} zu erreichen. Der nunmehr einsetzende Abbau äussert sich in einer erst langsam erfolgenden, sich zwischen dem dritten und vierten Versuchstag aber zusehends verstärkenden Reduktion der Schwanzstammlänge. Am siebten Versuchstag haben sich die Versuchstiere zu lebensfähigen Jungfröschchen mit kurzem Schwanzstummel umgewandelt. Da die Larven eine stetige Nahrungszufuhr erhielten und weil ferner ihre autochthone Schilddrüsenaktivität in hinreichendem Masse gehemmt wurde, nimmt die Schwanzstammlänge bei den Kontrolltieren während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich zu. Aus dem eben beschriebenen Verhalten älterer Kaulquappen geht hervor, dass der für die Normalmetamorphose charakteristische sigmoide Kurvenverlauf der Schwanzstamm-Reduktion (siehe Fig. 7, unterer Teil der Darstellung) in der Thyroxinmetamorphose eingehalten wird. Gelangen hingegen jüngere Kaulquappen zur Thyroxinbehandlung, so wird der Reaktionsablauf in der Regel durch das vorzeitige Eingehen der Versuchstiere bereits bei einer Schwanzstamm-Reduktion von 50—60% abgebrochen, sodass der sigmoide Kurvenverlauf nicht zur Geltung kommen kann.

Der Flossensaum-Abbau kann durch fortlaufende Ausmessung der Flossensaumhöhe in einem definierten Abstand *d* auf der Schwanzlängsachse (Messtrecken L 5 und L 6) biometrisch erfasst werden. Der obere Teil von Fig. 8 zeigt den Verlauf der Reduktion des ventralen Flossensaumes bei Individuen, die im Jungkaulquappen-Stadium unter den dauernden Einfluss des Thyroxins gelangt sind. Bei der Betrachtung der Darstellung fällt zunächst auf, dass die Streuung der Flossensaumhöhe bedeutend grösser als diejenige der Extremitäten- und Schwanzstammlänge ist; sie schwankt hier zwischen 8 und 9% des Mittelwertes. Wir können ferner feststellen, dass die durch das Thyroxin verursachte Flossensaum-Reduktion erst ungefähr 40 Stunden nach Behandlungsbeginn deutlich erkennbar einsetzt. Im Gegensatz zum Normalgeschehen (siehe unterer Teil von Fig. 8) zeigt der Kurvenverlauf der Flossensaum-Reduktion sigmoide Gestalt. Bei der Betrachtung der Darstellung fällt ferner auf, dass die Flossensaumhöhe auch bei den Kontrolltieren eine kontinuierlich erfolgende Verminderung

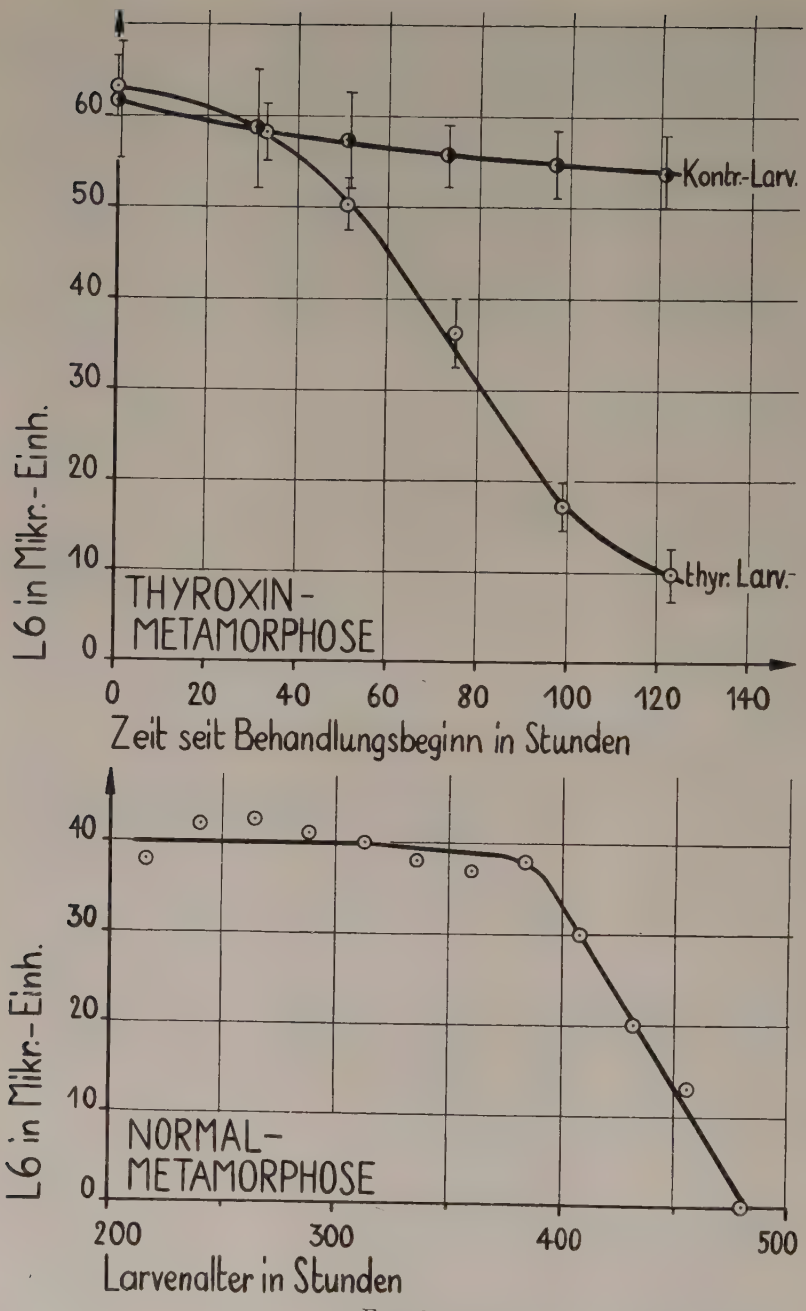


Fig. 8.

Rana temporaria. Reduktion des ventralen Flossensaumes während der Thyroxin- und Normalmetamorphose (L 6 = Ventrale Flossensaumhöhe im Abstand $d = 1{,}65$ mm auf der Schwanzlängsaxe).

erfährt. Wie aus Parallelversuchen mit gleichaltrigen Larven, die eine stetige Nahrungszufuhr während des Versuches erhielten, hervorgeht, muss diese Reduktion auf den Einfluss der Inanition zurückgeführt werden, dem die Larven in dem Fig. 8 zugrundeliegenden Thyroxin-Versuch unterworfen waren. Wir ersehen hieraus, dass bei der Durchführung von Thyroxin-Hungerversuchen mit dem Auftreten von Hungerwirkungen zu rechnen ist, die bei ihrer Nichtberücksichtigung die Ermittlung des Thyroxineffektes bedeutend verfälschen würden.

Das Verhalten der Mundteile. Die Mundbewaffnung der typischen Anurenlarve gliedert sich in die beiden Hornkiefer und das diese allseitig umrahmende Vestibulum oris. Der Boden des Vestibulums (Unterlippe) wird distal durch einen Papillenkranz (Lippensaum) begrenzt. Dieser erstreckt sich bei Kaulquappen von *Rana temporaria* bis über die Mundwinkel hinaus, fehlt aber der Oberlippe. Auf Ober-und Unterlippe verlaufen in jeweils charakteristischer Zahl und Anordnung quergestellte Wülste, die sog. Kammplatten oder „lames pectinées" der belgischen Autoren, in die Hornzähnchen (Lippenzähnchen) eingesenkt sind. Die Ränder des Ober- und Unterkiefers (Hornschnabel) tragen eine massive Hornschicht mit nebeneinander angeordneten Hornzähnchen, die, aus dem Epithelwulst hervorragend, dem Schnabel die Gestalt einer Säge verleihen.

Die makroskopischen Veränderungen, die die Hornkiefer während der Metamorphose erfahren, bestehen einerseits in der Abstossung der Hornschichten und Hornzähnchen, andererseits in der nachfolgenden Rückbildung der Kieferränder. Der Abbau der Unterlippe erfolgt in verschiedenen Etappen. Ungefähr gleichzeitig mit der Abstossung der Lippenzähnchen beginnt der Lippensaum zu schwinden. Daran anschliessend erfolgt die Einschmelzung der Kammplatten und der Unterlippenbasis. Dabei fällt auf, dass sich die mediane Partie der Unterlippe stets rascher zurückbildet als die lateralen Unterlippenbereiche (Existenz eines mediolateralen Resorptionsgradienten). Quantitativ wurde der Unterlippen-Abbau durch die fortschreitende Ausmessung der medianen und der lateralen Unterlippendistanz (Messgrössen L 8 und L 9) zu erfassen versucht.

Das Verhalten des Operkulums. Eine eingehendere Betrachtung erfordert das Phänomen der Operkelperfo-

ration. Wir verzichten dabei auf die Diskussion der zahlreichen Untersuchungen, die sich mit dem Auslösungsmechanismus dieses Prozesses befassen und beschränken uns hier auf die Beschreibung des für thyroxinbehandelte Frühstadien charakteristischen Reaktionsablaufs.

Während der frühlarvalen Anurenentwicklung werden die inneren Kiemen von einer Hautduplikatur, der Operkularfalte, überwachsen, die schliesslich mit der Rumpfhaut verschmilzt. Gleichzeitig bildet sich bei *Rana*-Larven auf der linksseitigen Verwachsungstelle der Operkularfalte ein Atemporus (Spirakulum) aus, der den Austritt des vom Mund her in den Peribranchialraum gelangenden Atemwassers ermöglicht. Unter den beiden Operkeln entwickeln sich die Vorderextremitäten. Um während der Metamorphose ins Freie gelangen zu können, müssen diese die Körperdecke „durchbrechen". Dieser Prozess wird in der Literatur als Operkelperforation bezeichnet. Die klassischen Versuche von Braus (1906) zeigen, dass die Perforation der Operkeln im Normalgeschehen nicht durch Druckwirkung der Vorderextremität, sondern durch die Histolyse des Operkulums zustandekommt.

Die Einschmelzung der Operkel kann durch Thyroxinbehandlung vorzeitig ausgelöst werden (Romeis, 1923); sie scheint im Gegensatz zur Auffassung von Helff und Mitarbeitern unabhängig vom Abbau der inneren Kiemen zu verlaufen (Alphonse und Baumann, 1935). Die Geschwindigkeit, mit der die Resorption der Operkel einsetzt und abläuft, hängt in spezifischer Weise von der Thyroxindosierung ab. Die Einschmelzung erfolgt ähnlich wie in der Normalmetamorphose, doch stets mit grösserer Intensität als im Normalgeschehen (Alphonse und Baumann, 1935). In Fig. 9 gelangen die charakteristischen Veränderungen, die das linke Operkulum während der Thyroxinmetamorphose jüngerer Kaulquappen erfährt, zur Darstellung. Stadium I zeigt den Ausgangszustand, der durch das Vorhandensein eines intakten Spirakulums gekennzeichnet ist. Unter dem direkten oder wahrscheinlicher indirekten Einfluss des Thyroxins erfolgt zunächst die Resorption des Ausatemschlauches. Die Konturen desselben verschwinden mit zunehmender Versuchszeit immer mehr und seine Ausmündungsöffnung verengert sich zusehends. Im Stadium II hat die Operkularöffnung eine so starke Verringerung erfahren, dass sie nur noch mit stärkerer Vergrösserung zu erkennen ist. An einzelnen Individuen

kann ein vollkommener Verschluss der Operkularöffnung beobachtet werden. Nach Erreichen dieses Stadiums setzt im Bereich des stark verengerten Atemloches die eigentliche Histolyse des Operkulums

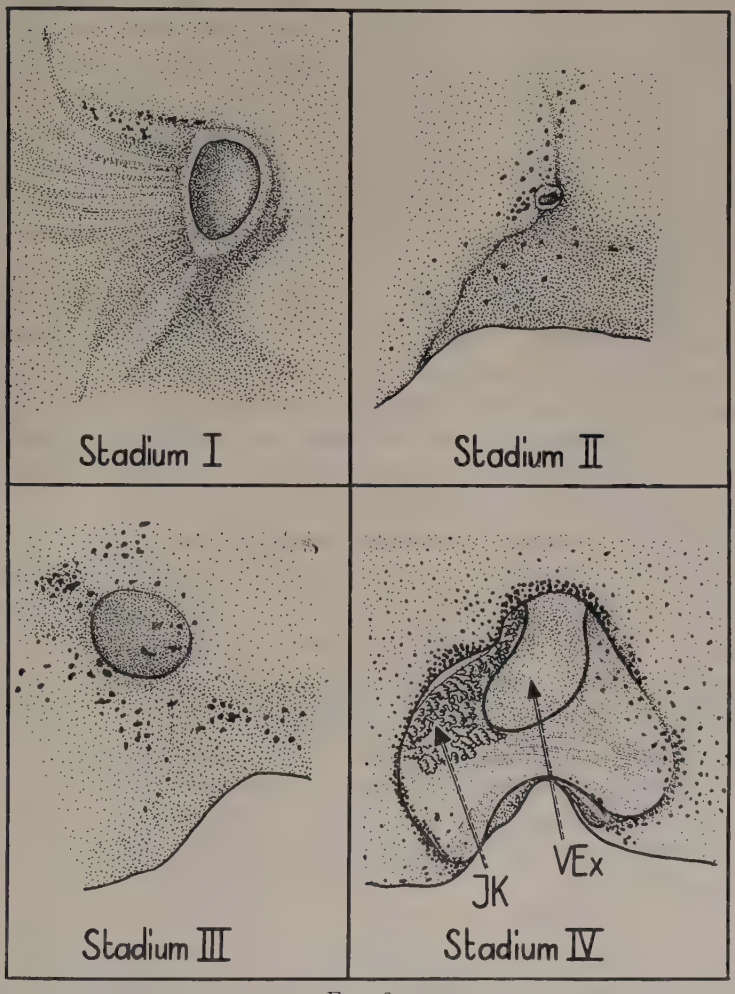


Fig. 9.

Die charakteristischen Veränderungen des linken Operkulums während der Thyroxinmetamorphose jüngerer Kaulquappen von *Rana temporaria* (JK = innere Kiemen; VEx = Vorderextremität).

ein. In der Regel etwas später beginnt sich dieser Prozess an der entsprechenden Stelle auf der rechten Körperseite abzuzeichnen. Es entsteht in der Folge ein kreisrundes bis ovales Resorptionsloch

(Stadium III). Von diesem Zeitpunkt an beginnt der Einschmelzungsprozess bei höherer Thyroxindosierung mit stärkerer Intensität zu verlaufen und erfasst immer grössere Bereiche des Operkulums. Das nunmehr entstandene, stark geweitete Resorptionsloch legt die noch unterentwickelten Vorderextremitäten und die im allgemeinen noch bis an die Spitzen durchbluteten inneren Kiemen frei (Stadium IV). Der Rahmen des Operkularfensters zeigt, ähnlich wie die Spitze des in diesem Metamorphose-Stadium in intensivem Abbau begriffenen Schwanzstammes, eine starke Pigmentierung. Bald nach Erreichen dieses Stadiums gehen die hochgradig thyreotischen Versuchstiere an den erlittenen Entwicklungsstörungen ein.

Bei jungen Kaulquappen lässt sich die Reaktion des linken Operkulums durch die fortlaufende Ausmessung des maximalen Durchmessers der Operkularöffnung (Messtrecke L 7) quantitativ erfassen. Fig. 10 zeigt den Verlauf der Mittelwertkurve, die anhand von fünf Individuen, die im Stadium der Jungkaulquappe unter den dauernden Einfluss des Thyroxins gelangten, gewonnen wurde. Mit der schon kurze Zeit nach Behandlungsbeginn bei den Versuchstieren einsetzenden Reduktion des Spirakulums erfährt die Messtrecke L 7 eine kontinuierliche Verminderung, um nach ungefähr 60 Stunden einen Minimalwert X_{min} zu erreichen. Mit der nunmehr einsetzenden Histolyse des Operkulums beginnt der Durchmesser der Operkularöffnung rasch anzuwachsen, wobei die Streuung der individuellen Messwerte beträchtlich zunimmt. Obschon die Larven während des Versuches keine Nahrungszufuhr erhielten, erleidet die Struktur des Spirakulums bei den Kontrolltieren keine Veränderungen, sodass der Durchmesser der Operkularöffnung während der gesamten Versuchsdauer ein nahezu konstanter bleibt.

Das Verhalten der Kopf-Rumpfpartie. Im Zusammenhang mit dem allgemeinen Metamorphosegeschehen erfährt die Kopf-Rumpfpartie der Anurenlarve eine deutliche Verminderung ihrer linearen Abmessung (Messtrecke L 2). Diese ist zu einem Teil auf den allgemeinen Wasserverlust, den die unter dem Einfluss des Thyroxins stehenden Gewebe erfahren, zum andern Teil auf die Veränderungen der Struktur der inneren Organe zurückzuführen. Gelangt die Thyroxin-Aussenkonzentration 10 γ-% zur Dauereinwirkung auf jüngere, mittlere und ältere Kaulquappen,

so beträgt die Längenreduktion der Kopf-Rumpfpartie beim Eingehen der Versuchstiere ca. 16—19%. In der Normalmetamorphose von *Rana temporaria* beobachten wir eine Reduktion von ungefähr 18%.

2. *Die Ermittlung der Reaktionscharakteristiken*

Im Kaulquappen-Versuch lässt sich der morphogenetische Thyroxineffekt quantitativ als eine Wachstumsförderung vom Betrag w (Testreaktionen der Körperbereiche mit adulter Potenz) oder als eine Reduktion vom Betrage r (Testreaktionen der transitorischen Körperteile und der Kopf-Rumpfpartie) ausdrücken. Tragen wir den relativen Thyroxineffekt E als Funktion der Versuchszeit t in einem rechtwinkligen Koordinatensystem auf, so erhalten wir einen Kurvenverlauf, den wir als Reaktionscharakteristik [$E = f(t)$] definieren. Entsprechend den verschiedenen Reaktionen auf den Thyroxinreiz unterscheiden wir zwischen Wachstums- und Reduktionscharakteristik. Unsere Aufgabe besteht nun darin, den morphogenetischen Thyroxineffekt aus dem Verlauf der Mittelwertkurven, die wir durch fortlaufende Ausmessung der verschiedenen Metamorphose-Grössen erhalten, zu bestimmen.

a) Der morphogenetische Thyroxineffekt an den Hinterextremitäten. Die zur Erfassung der Hinterextremitäten-Reaktion (Wachstumsbeschleunigung) verwendete Messgrösse L3 nimmt entsprechend dem fortschreitenden Längenwachstum der Hinterextremitätenanlage zu. Bedeutet X_T ihr Betrag zur Zeit t bei den Larven, die unter dem Einfluss des Thyroxins stehen, X_K ihr Betrag zur selben Zeit bei den Kontrolltieren, so beträgt die durch die Thyroxinbehandlung verursachte relative Wachstumsförderung im Zeitpunkt t:

$$w = \frac{X_T - X_K}{X_K} \qquad (1)$$

Die Grösse w gibt für eine bestimmte Versuchszeit die Differenz zwischen der Hinterextremitätenlänge der thyroxinbehandelten Individuen und derjenigen der Kontrolltiere, relativ zur Hinterextremitätenlänge der Kontrolltiere, an. Für $X_T = X_K$, d. h. für jenen Spezialfall, in dem die Hinterextremitäten der thyroxinbehandelten Larven gleich rasch gewachsen sind wie diejenigen der Kontrolltiere (unterschwellige Thyroxinbehandlung) folgt mit Gl. (1) für die relative Wachstumsförderung der richtige Betrag $w = 0$.

Die nach Gl. (1) erfolgende Berechnung der Wachstumsförderung ergibt auch in jenen Fällen, in denen die Extremitätenanlagen der Kontrolltiere überhaupt kein Wachstum zeigen (Thyroxin-Hungerversuch unter bestimmten Ausgangsbedingungen), oder auch dann, wenn die Hinterextremitätenknospen erst im Verlauf der Versuche messbar

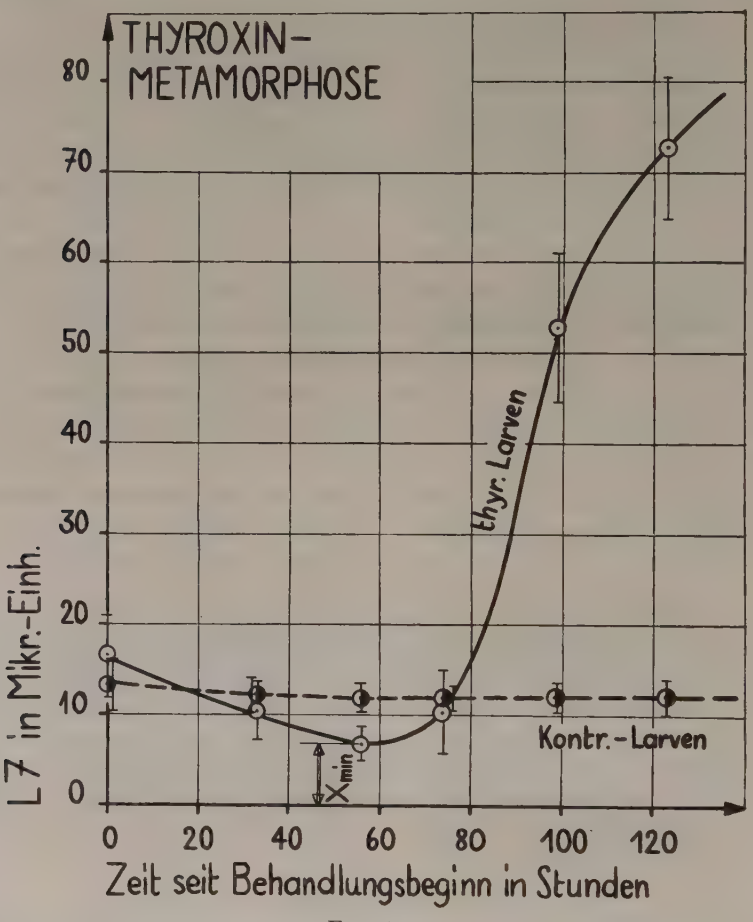


Fig. 10.

Biometrische Analyse der Veränderungen der Operkularöffnung während der Thyroxinmetamorphose jüngerer Kaulquappen von *Rana temporaria* (L 7 = max. Durchmesser der Operkularöffnung).

werden (Thyroxineinwirkung auf Embryonen und auf Junglarven), stets endliche Werte. Diese Methode beruht aber auf der Voraussetzung, dass bei Versuchsbeginn ($t = 0$) X_T und X_K miteinander identisch sind oder zumindest nur in geringfügigem Masse voneinander abweichen

(Voraussetzung der statistischen Einheitlichkeit des Versuchs-Ausgangsmaterials). In jenen Fällen, in denen X_T (0) zufällig in grösserem Masse von X_K (0) abweicht, wird der Blindwert X_K (t) auf identische Ausgangsbedingungen [X_T (0) = X_K (0)] reduziert.

b) Der morphogenetische Thyroxineffekt am Schwanzstamm, Flossensaum, an der Unterlippe und an der Kopf-Rumpfpartie. Entsprechend dem in den Fig. 7 und 8 dargestellten Verlauf der Mittelwertkurven vermindern sich die linearen Metamorphose-Grössen X = L2, L4, L5, L6, L8, und X = L9 jeweils nach Ueberschreiten eines Maximalwertes entsprechend der mit fortschreitender Versuchszeit zunehmenden Resorption des Schwanzstammes, des Flossensaumes und der Unterlippe, sowie mit der fortschreitenden Längenreduktion der Kopf-Rumpfpartie. Ist die lineare Metamorphose-Grösse X bei den Larven, die unter dem Einfluss des Thyroxins stehen, nach Ueberschreiten ihres Maximalwertes $X_{T,\,max}$ im Zeitpunkt t auf den Betrag X_T gesunken, dann beträgt die relative Längenreduktion im Zeitpunkt t bei den Versuchstieren

$$r_T = \frac{X_{T,\,max} - X_T}{X_{T,\,max}} \qquad (2)$$

Die Grösse r_T drückt die Differenz aus zwischen der linearen Abmessung des transitorischen Organs der behandelten Larven im Zeitpunkt t und seiner maximalen Abmessung, die es im Verlaufe des Thyroxinversuches erreicht hat, relativ zur Maximallänge.

Vermindert sich X_T nach Erreichen des Maximalwertes mit zunehmender Versuchszeit nicht, d. h., setzt die Testreaktion nicht ein [$X_T = X_{T,\,max}$], so folgt mit Gl. (2) der richtige Wert $r_T = 0$. Ist die lineare Abmessung des reagierenden Körperteils nach Ueberschreiten ihres Maximalwertes im Zeitpunkt t auf $X_T = 0$ gesunken (vollkommener Abbau des transitorischen Organs), dann ergibt sich mit Gl. (2) ebenfalls der richtige Wert $r_T = 1$.

Unter gewissen Versuchsbedingungen erfahren die linearen Organabmessungen X = L2, L4, L5, L6, L8, L9 auch im Blindversuch eine geringfügige Reduktion (Beispiel siehe Fig. 8). Dieser sich an den Kontrolltieren manifestierende Blindwert r_K [ermittelt entsprechend Gl. (2) für X_K und $X_{K,\,max}$] muss natürlich bei der Bestimmung des relativen Thyroxineffektes berücksichtigt werden. Die im Zeitpunkt t durch das Thyroxin verursachte relative Längenreduktion beträgt somit unter allgemeinen Bedingungen

$$r = \frac{X_{T,\,max} - X_T}{X_{T,\,max}} - \frac{X_{K,\,max} - X_K}{X_{K,\,max}} \qquad (3)$$

Ein Reduktions-Blindwert kann dann auftreten, wenn die Larven während des Thyroxinversuches keine Nahrungszufuhr erhalten (Thyroxin-Hungerversuch). Er stellt in diesem Falle eine reine Hungerwirkung dar. Erfahrungsgemäss zeigt sich, dass vor allem der Flossensaum eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber dem Einfluss der Inanition aufweist, während Schwanzstamm, Unterlippe und Kopf-

Rumpfpartie in viel geringerem Masse durch den Hunger angegriffen werden. Verwenden wir im Thyroxin-Hungerversuch Larven, die sich bei Behandlungsbeginn in gut genährtem Zustand befinden, so sind die bei kürzeren Versuchszeiten (100 bis 200 Stunden bei 21° C) am Schwanzstamm, an der Unterlippe und an der Kopf-Rumpfpartie auftretenden Hungereffekte in der Regel so geringfügige, dass sie bei der Bestimmung des Thyroxineffektes vernachlässigt werden dürfen.

c) Der morphogenetische Thyroxineffekt am linken Operkulum. Entsprechend dem in Fig. 10 dargestellten Verlauf der Mittelwertkurve nimmt der Durchmesser der Operkularöffnung X = L 7 bei den Versuchstieren nach Ueberschreiten eines Minimalwertes mit der nunmehr einsetzenden Einschmelzung des Operkulums kontinuierlich zu. Der Durchmesser sei im Zeitpunkt t auf den Wert X_T angewachsen. Da im Blindversuch unter keinen Umständen eine Einschmelzung des Operkulums erfolgt — auch bei Hungerversuchen nicht —, definieren wir den Thyroxineffekt an der Operkularmembran durch die Verhältniszahl

$$q = \frac{X_T}{X_{T,\,\min}} \tag{4}$$

Die Zahl q gibt an, wieviel mal so gross im Zeitpunkt t der Durchmesser der Operkularöffnung als sein Minimalwert geworden ist.

3. *Die Definition der Reaktionskriterien und die Bestimmung der regionalen Latenzzeit*

Den Zeitpunkt, in dem sich die Metamorphose-Reaktion (Testreaktionen der Thyroxinwirkung) an einem bestimmten Körperbereich deutlich erkennbar abzuzeichnen beginnt, bezeichnen wir inskünftig als regionalen Metamorphose-Start, die Zeit, die zwischen dem Beginn der Thyroxinbehandlung und dem regionalen Metamorphose-Start verstreicht, als regionale Latenzzeit.

Erfahrungsgemäss erweist sich der regionale Metamorphose-Start in keinem Falle als ein zeitlich scharf determinierter (siehe Fig. 6, 7, 8, 10). Die Bestimmung der regionalen Latenzzeit erfordert daher die Festlegung eindeutiger Reaktionskriterien. Unseres Wissens nach bedienten sich bisher sämtliche Autoren bei der Ermittlung der Latenzzeiten ausschliesslich rein qualitativ definierter Reaktionskriterien, wie z. B. bei Etkin (1935): „beginning of anal canal piece reduction", „lips markedly reduced", „first evidence of gross tail fin resorption" etc. Eine derartige Fest-

legung des regionalen Metamorphose-Starts hat den Nachteil, dass die Ermittlung der Latenzzeiten von der persönlichen Einstellung des Beobachters abhängig ist, wodurch natürlich gröbere Täuschungen nicht ausgeschlossen bleiben. Aus diesem Grunde verwendete ich in dieser Untersuchung soweit als möglich quantitativ definierte Reaktionskriterien.

Ich definiere die Reaktionskriterien durch eine minimale Wachstumsförderung w_R resp. durch eine minimale Reduktion r_R Dieser den regionalen Metamorphose-Start markierende minimale Thyroxineffekt E_R muss verschiedenen Bedingungen genügen, die einerseits durch das Ausmass der auftretenden Streuungen des Thyroxineffektes, andererseits durch den Reaktionsablauf selbst bestimmt werden. Sein Betrag muss einerseits so gross gewählt werden, dass er statistisch gesichert, d. h. signifikant different von $E = 0$ ist, andererseits aber möglichst klein gewählt werden, sodass er einem Zeitpunkt entspricht, in dem die Metamorphose-Reaktion noch nicht wesentlich fortgeschritten ist. Verwenden wir zur Ermittlung des Thyroxineffektes Mittelwertkurven, die wir durch fortlaufende Ausmessung derselben fünf Individuen erhalten, und verwenden wir zur Bestimmung der statistischen Sicherung die gebräuchlichen Sicherheitsschwellen $P = 0{,}01$ und $P = 0{,}05$ (siehe Linder, 1945), dann müssen die als Reaktionskriterien dienenden minimalen Thyroxineffekte E_R innerhalb den folgenden Schranken gewählt werden:

1. Dorsaler und ventraler Flossensaum:
   Thyroxinbedingte Reduktion der Flossensaumhöhe (L 5 und L 6) in einem definierten Abstand d auf der Schwanzlängsachse . . $0{,}15 \leq r_R \leq 0{,}25$
2. Mediane und laterale Partie der Unterlippe:
   Thyroxinbedingte Reduktion der medianen und lateralen Unterlippendistanz (L 8 und L 9) . . . . . $0{,}15 \leq r_R \leq 0{,}25$
3. Zentrale Schwanzpartie:
   Thyroxinbedingte Reduktion der Schwanzstammlänge (L 4) . . . . . $0{,}07 \leq r_R \leq 0{,}14$

4. Kopf-Rumpfpartie:
Thyroxinbedingte Reduktion der Kopf-Rumpfflänge (L 2) . . . . . $0{,}08 \leq r_R \leq 0{,}12$

5. Linkes Operkulum:
Thyroxinbedingte Operkular-Reduktion, ermittelt anhand der Messtrecke L 7 . . . . $2 \leq q_R \leq 3$

6. Hinterextremitätenanlagen:
Thyroxinbedingte Wachstumsförderung, ermittelt anhand der Messtrecke L 3 . . . . $0{,}3 \leq w_R \leq 0{,}6$

Die jeweils gewählten Reaktionskriterien werden bei der Besprechung der verschiedenen Versuche angeführt. Bei vergleichenden Untersuchungen fanden stets dieselben Reaktionskriterien Verwendung.

Die Bestimmung der Latenzzeit mit Hilfe quantitativer Reaktionskriterien kann keine absolut befriedigende sein, insofern nämlich, als eben durch sie ein Zeitpunkt erfasst wird, in dem die Testreaktion bereits minimal in Gang gekommen ist. Die objektive Bestimmungsmethode verunmöglicht aber grobe Täuschungen und liefert, da der jeweils begangene Fehler bei Verwendung derselben Reaktionskriterien stets derselbe ist, jedenfalls absolut vergleichbare Ergebnisse.

Zur praktischen Bestimmung der regionalen Latenzzeit wird die Wachstumsförderung w resp. die Reduktion r und die Verhältniszahl q nach den auf S. 31, 33, 34 angegebenen Formeln (1) bis (4) anhand des empirischen Zahlenmaterials berechnet und in Abhängigkeit von der „Zeit seit Behandlungsbeginn“ (t) auf der Ordinatenachse eines rechtwinkligen Koordinatensystems aufgetragen (Reaktionscharakteristik). Die Verbindung der einzelnen Punkte erfolgt in der Regel durch Linienzüge, beim Auftreten grösserer Streuungen durch Anlegen einer Approximationskurve. Im Ordinatenabstand, der den jeweils verwendeten Reaktionskriterien w_R, r_R und q_R entspricht, wird parallel zur Zeitachse eine Horizontale gezogen. Die regionale Latenzzeit ist dann gleich dem Abszissenwert des Schnittpunktes, den die Horizontale mit der Reaktionscharakteristik bildet.

Die Testreaktion des Hornkiefers musste mit Hilfe der qualitativ definierten Reaktionskriterien „thyroxinbedingte Defekte an der Kieferbehornung“ und „Kieferbehornung bei allen Individuen vollkommen abgestossen“ erfasst werden.

4. *Die Induktion der Metamorphose-Teilprozesse*

Aus dem Verhalten thyroidektomierter Kaulquappen muss geschlossen werden, dass die Mehrzahl der Abbau-, Neuentwicklungs- und Umgestaltungsprozesse in der Anurenmetamorphose unter dem

Einfluss des Schilddrüsenhormons zustandekommt. Es erhebt sich nun die Frage, auf welche Weise das Thyroidhormon oder eines seiner metamorphose-wirksamen Spaltprodukte (Thyroxin, Dijodtyrosin) in das larvale Entwicklungsgeschehen eingreift und die verschiedenen Körperbereiche der Anurenlarve zur Metamorphose-Reaktion veranlasst (Induktionsmechanismus der Anurenmetamorphose).

Zunächst ergibt sich, dass das Schilddrüsenhormon seine morphogenetischen Wirkungen nicht auf dem Umweg über das zentrale Nervensystem ausübt. Verschiedene Transplantationsversuche an Amphibienlarven machen einen peripheren Angriffspunkt des Schilddrüsenhormons wahrscheinlich. Den exakten Beweis hierfür liefern Versuche, in denen Teile des Zentralnervensystems vor Beginn der Metamorphose durch operativen Eingriff ausgeschaltet wurden. So bleibt die Metamorphose-Reaktion an jenen Organen nicht aus, die durch frühzeitige Rückenmarksentfernung vom zentralen Nervensystem isoliert worden sind (Cotronei, 1927).

Die Tatsache, dass die Umwandlung durch peripheren Angriff des Thyroidhormons eingeleitet und gesteuert wird, schliesst nicht aus, dass die Reaktionen gewisser Körperpartien durch indirekte Schilddrüsenwirkungen verursacht werden. In gewissen Fällen scheint es, als ob zwischen der initialen Wirkung des Schilddrüsenfaktors und dem Zustandekommen bestimmter Abbau-, Neuentwicklungs- oder Umgestaltungsprozesse eine Reihe von miteinander in kausalem Zusammenhange stehenden Metamorphose-Teilprozessen eingeschaltet wäre.

Verschiedene Autoren (Champy, 1922; Romeis, 1923) beobachteten übereinstimmend, dass sich die morphologisch feststellbaren Wirkungen der Schilddrüsenbehandlung primär in einer Steigerung der mitotischen Aktivität in bestimmten Körperregionen manifestieren, und dass sich erst nachträglich Resorptionsprozesse einstellen. Champy (1922) sowie Champy und Radu (1931) deuten diesen Sachverhalt durch die Annahme, dass der Nährstoffverbrauch, der durch das beschleunigte Wachstum der adulten Organe verursacht wird, die Einschmelzung der transitorischen Körperteile zur Folge habe, da der sich in Umkonstruktion befindliche Darm eine aktive Nahrungsaufnahme verhindere. Demgegenüber gelangt Jarisch (1920) auf Grund seiner Fütterungsversuche an Bufo-Larven zur Auffassung, dass die Rückbildungsvorgänge als das

auslösende Moment für die beschleunigte Entwicklung der adulten Organe in Frage kommen.

Existierte ein Zusammenhang zwischen den aufbauenden und den resorptiven Prozessen, so müsste die frühzeitig erfolgende totale Entfernung des Ruderschwanzes — der bekanntlich in der Anurenmetamorphose den grössten Teil des Abbaumaterials liefert — das Wachstum der adulten Organe beeinflussen. NAKAMURA (1936 *a*) entfernte den Ruderschwanz bei Kaulquappen von *Bufo vulgaris*, nachdem deren Hinterextremitäten eine Länge von 1,5 mm. erreicht hatten. Während Prometamorphose und Metamorphose-Klimax erfolgten nun aber Hinterextremitätenwachstum und -differenzierung bei den schwanzlosen Individuen nahezu gleich rasch wie bei den Kontrolltieren und der Gesamtablauf der Umwandlung wurde in keiner Weise durch den operativen Eingriff beeinträchtigt. Mit NAKAMURA muss aus diesem Versuchsergebnis geschlossen werden, dass die aufbauenden und resorptiven Prozesse unabhängig voneinander ablaufen, somit also gleichgestellte Teilerscheinungen der Anurenmetamorphose darstellen.

Es muss ferner die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass von den in Abbau, Neuentwicklung oder in Umgestaltung befindlichen Körperpartien Wirkungen auf benachbarte Körperbereiche ausgeübt werden, die für deren Metamorphose-Reaktion mitbestimmend oder gar allein determinierend sind. So scheinen beispielsweise am Zustandekommen der Operkularperforation neben dem direkten Einfluss des Schilddrüsenhormons nicht nur interne Faktoren des Operkularintegumentes, sondern auch die Sekrete der Hautdrüsen des Peribranchialraumes und der Vorderextremitäten sowie die histolytischen Produkte der in Abbau begriffenen inneren Kiemen beteiligt zu sein (BLACHER, HELFF, LIOSNER und WORONZOWA, WEBER: siehe Zusammenstellung der Ergebnisse bei NEEDHAM, 1942); vielleicht sind es aber allein dieunter dem Einfluss des Thyroxins erfolgenden Umwälzungen in der Blutgefässversorgung des Operkulums, die dessen Einschmelzung verursachen (ALPHONSE und BAUMANN, 1935). Durch Transplantation der fraglichen Körperteile kann entschieden werden, ob deren Metamorphose-Reaktion unter dem direkten Einfluss des Schilddrüsenhormons induziert wird, oder ob für deren Metamorphose-Reaktion regionale Einflüsse (Nach-

barschaftswirkungen) bestimmend sind. Reagieren die in fremde Körperregionen desselben oder eines anderen artgleichen Individuums verpflanzten Körperteile während der Metamorphose herkunftsgemäss, so muss angenommen werden, dass sie durch hormonale Direktwirkung zur Metamorphose-Reaktion veranlasst werden; reagieren die Transplantate hingegen in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Lage im Gesamtorganismus, so muss angenommen werden, dass sie durch indirekte Einflüsse des Schilddrüsenhormons zur Metamorphose-Reaktion aufgerufen werden. Zahlreiche an Anuren- und Urodelenlarven durchgeführte Versuche zeigen nun, dass die Transplantate unabhängig von ihrer Lage im Gesamtkörper in der ihnen eigenen, herkunftgemässen Weise synchron mit dem Transplantat-Empfänger metamorphosieren. Dieses Verhalten konnte für die Mehrzahl der durch Schilddrüsenstoffe beeinflussbaren Organe und Organteile festgestellt werden: Für die Kiemen der Urodelenlarve von Kornfeld (1914), für den Darm von Sembrat (1924), für die Mundteile der Anurenlarve von Nakamura (1936 *b*), für die Anlage der Anurenzunge von Helff (1929), für die Extremitätenanlagen der Anuren von Schubert (1926, 1927), für Muskelfragmente des Kaulquappenschwanzes von Helff und Clausen (1929), für Hautpartien des Kaulquappenschwanzes von Lindeman (1929) und für ganze Anurenschwänze von Geigy 1937/1941 *b*.

Die besprochenen Versuchsergebnisse führen uns somit zu folgender Auffassung über das Zustandekommen der Metamorphose-Teilprozesse: Diejenigen Organanlagen, Organe und Organteile der Anurenlarve, deren Metamorphose-Verhalten in irgend einer Weise von der Aktivität der Schilddrüse abhängt, werden in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle unabhängig voneinander unter dem direkten Einfluss des diffus im Körper zur Verteilung gelangenden Schilddrüsenhormons zur Reaktion veranlasst. Die spezifische Reaktionsweise dieser Körperbereiche (Abbau, Entwicklungsbeschleunigung oder Umgestaltung) wird durch Faktoren bestimmt, die in diesen selbst innewohnen (bereitschaftsbestimmende Faktoren). In gewissen

Einzelfällen (Operkularperforation) ist es jedoch wahrscheinlich, dass regional sich auswirkende indirekte Einflüsse des Schilddrüsenhormons an der Auslösung der Organreaktionen mitwirken oder eventuell sogar allein für das Zustandekommen der letzteren massgebend sind.

Weitere Einblicke in die Wirkungsweise des Schilddrüsenhormons gewinnen wir durch biometrische und histologische Analyse des regionalen Metamorphoseablaufs bei Larven, die in reaktionsfähigem Zustand einer überschwelligen Thyroxinbehandlung unterzogen wurden.

Fig. 11 veranschaulicht die Induktion des Schwanzstamm-Abbaus bei Larven von *Rana temporaria*, die im Stadium der mittleren Kaulquappe mit in Kerbung begriffenen Hinterextremitäten-Paletten (Gesamtlänge der Larven: L 1 = 29 mm; Hinterextremitätenlänge: L 3 = 1,27 mm) unter den dauernden Einfluss der konstanten Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 10$ γ-% (= 1 : 10'000'000) gelangten. Dass sich der Schwanzstamm der Versuchs- und Kontrolltiere bei Behandlungsbeginn in reaktionsbereitem Zustande befand, geht daraus hervor, dass dieser Körperteil bereits bei um mehrere Wochen jüngeren Larven in spezifischer Weise auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermag.

In dem Fig. 11 zugrundeliegenden Versuch erfolgte die Aufzucht der Larven bei einer Thermostatentemperatur von 22,4° C und bei Vollernährung der Versuchs- und Kontrolltiere mit Brennesselpulver. Um den Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität auf die Wirkung des applizierten Thyroxins auszuschalten, wurden Versuchs- und Kontrolltiere vor und während der Thyroxinbehandlung unter den Einfluss der hinreichend schilddrüsenhemmenden Tetramethylthioharstoff-Konzentration 1: 100'000 gebracht. Da im Verlauf des Versuches eine periodische Erneuerung des Thyroxinbades vorgenommen wurde, um den durch die Thyroxinaufnahme bedingten Thyroxinverlust der Aussenlösung fortlaufend zu kompensieren, darf angenommen werden, dass die Thyroxin-Aussenkonzentration ihren Anfangswert c_a (0) = 10 γ-% praktisch während der gesamten Versuchsdauer beibehielt.

Unmittelbar nach Behandlungsbeginn beginnt das Thyroxin in den Körper der Versuchstiere einzudringen. Dabei wirkt die Körper-

oberfläche der Kaulquappen offenbar als semipermeable Membran (Romeis, 1923; Bredt, 1933). Die Art und Weise, in der die Thyroxinaufnahme durch die Kaulquappen erfolgt, konnte von mir bis jetzt infolge methodischer Schwierigkeiten noch nicht abgeklärt werden. Theoretisch bestehen hierfür zwei verschiedene Möglichkeiten (siehe Hoeber, 1947): Das in der Badeflüssigkeit enthaltene Thyroxin gelangt entweder durch passive Penetration (Diffusion)

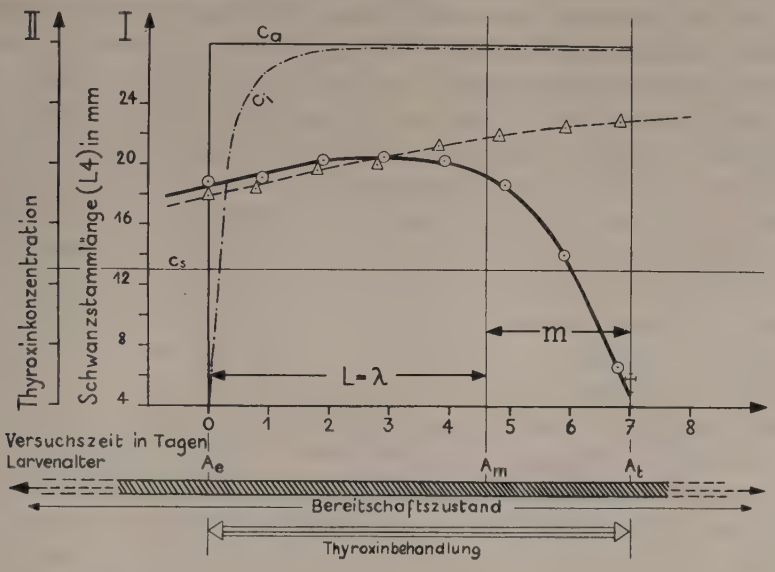


Fig. 11.

Die Auslösung des Schwanzstamm-Abbaus durch Thyroxin-Dauereinwirkung auf reaktionsbereite *Rana*-Larven (Versuchstiere: ⊙; Kontrollen: △).

oder durch aktiven Transport (Resorption) in das Körperinnere. Verbraucht resp. inaktiviert die Froschlarve kein Thyroxin, so würde die Thyroxin-Innenkonzentration c_i im Falle passiver Penetration, dem Fick'schen Diffusionsgesetz gehorchend, zuerst rasch anwachsen, um dann immer langsamer ansteigend einem Grenzwert $c_i(\infty)$ zuzustreben, der theoretisch nach unendlich langer, praktisch aber schon nach einer endlichen Zeitspanne erreicht wird. Je nach der Geschwindigkeit, mit der die Thyroxinaufnahme erfolgt, müsste sich in diesem Falle früher oder später ein Gleichgewicht zwischen Aussen- und Innenlösung einstellen (vergl. E. Sutter, 1944). Dieser hypothetische Spezialfall gelangt in

Fig. 11 zur Darstellung. Erfolgt hingegen die Absorption des Thyroxins durch resorptive Tätigkeit der Körperzellen, so würde der Badeflüssigkeit dauernd Thyroxin entzogen und es könnte sich kein Permeationsgleichgewicht einstellen.

Die Geschwindigkeit, mit der das Thyroxin durch die Kaulquappe aus der Badeflüssigkeit aufgenommen wird, lässt sich durch kurzfristige Thyroxineinwirkung auf reaktionsbereite Larven abschätzen. Während temporäre Behandlung durch schwache Thyroxin-Aussenkonzentrationen nur an den empfindlichsten Kaulquappen-Organen Metamorphosesymptome zu induzieren vermag (vergl. Etkin, 1935), können durch kurzfristige Einwirkung stärkerer Thyroxinkonzentrationen bei erhöhter Temperatur auch an den thyroxinunempfindlicheren Körperbereichen der Anurenlarve deutliche Metamorphoseanläufe erzielt werden. Um auf diesem Weg die Geschwindigkeit der Thyroxinaufnahme abschätzen zu können, exponierte ich mittlere Kaulquappen von *Rana temporaria* (Stadium der gekerbten Hinterextremitäten-Palette) bei 20° C während 225 min der Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 50$ γ-% (= 1: 2'000'000). Darnach wurden die Larven sorgfältig mit fliessendem Brunnenwasser abgewaschen, um an der Körperoberfläche anhaftenden Thyroxin wegzuschwemmen, und anschliessend in frischem Brunnenwasser aufgezüchtet. Bereits einige Tage nach Versuchsbeginn begannen sich die ersten sichtbaren Auswirkungen der Thyroxinbehandlung an den Versuchstieren abzuzeichnen (Beschleunigung des Hinterextremitätenwachstums), um sich in der Folge immer deutlicher zu manifestieren. Am 10. Tag hatten sich die thyreotischen Individuen in vierbeinige Stauchfröschchen mit klaffendem Mund und beträchtlich reduziertem Schwanzstamm umgewandelt, während die Kontrolltiere keinerlei Anzeichen einer bevorstehenden Metamorphose zeigten. Dieser Versuch zeigt, dass bei stärkerer Thyroxindosierung während der kurzen Behandlungszeit von 3¾ Stunden bereits soviel Thyroxin von den Kaulquappen aufgenommen worden ist, dass selbst längere Zeit nach Behandlungsbeginn noch eine ausreichende Menge dieses Stoffes im Körperinnern angereichert blieb, um auch an den unempfindlicheren Körperbereichen der Larve deutlich erkennbare morphogenetische Wirkungen entfalten zu können. Wir schliessen aus diesem Versuch, dass die Absorption des Thyroxins durch die Kaulquappe in Bezug auf die Dauer des in-

duzierten Metamorphoseablaufes mit relativ grosser Geschwindigkeit erfolgt.

Auf Grund dieses experimentellen Befundes darf somit angenommen werden, dass das in den Kaulquappenkörper eindringende Thyroxin praktisch unmittelbar nach Behandlungsbeginn in metamorphose-wirksamer Konzentration an den auf den Thyroxinreiz ansprechenden Geweben zur Wirkung gelangt, wenn mittlere bis stärkere Aussenkonzentrationen zur Applikation gelangen. Entsprechend dem in Fig. 11 schematisch dargestellten Verlauf wird die Thyroxin-Innenkonzentration c_i offenbar so rasch ansteigen, dass sie schon kurze Zeit nach Behandlungsbeginn den Betrag der Schwellenkonzentration c_s des Schwanzstammes erreicht und überschreitet.

Obschon anzunehmen ist, dass das Thyroxin bereits kurze Zeit nach Behandlungsbeginn in überschwelliger Konzentration am reaktionsbereiten Schwanzstamm-Material zur Wirkung gelangt, vermag es den Abbau desselben nicht sofort einzuleiten. Wie aus Fig. 11 hervorgeht, zeigt der Schwanzstamm nach Behandlungsbeginn zunächst noch weiterhin synchrones Wachstum bei Versuchs- und Kontrolltieren. Erst nach Ablauf des zweiten Behandlungstages beginnt sich der Einfluss des applizierten Thyroxins makroskopisch erkennbar in einer Hemmung des Längenwachstums dieses Körperteiles zu manifestieren, die schliesslich in fliessendem Übergang, über Wachstumsstillstand, zur intensiv verlaufenden Reduktion der zentralen Schwanzpartie führt (Reaktionskriterium: Schwanzstamm-Reduktion $r_R = 0{,}07$). Ein entsprechendes Verhalten zeigen auch die übrigen auf den Thyroxinreiz ansprechenden Körperbereiche der Anurenlarve. Aus den histologischen Untersuchungen von Bredt (1933) geht ferner hervor, dass sich während den ersten Behandlungstagen auch bei mikroskopischer Betrachtung keine Veränderungen an der Muskulatur und Chorda des Kaulquappenschwanzes nachweisen lassen, die auf den Einfluss des applizierten Thyroxins zurückzuführen sind.

Ich schliesse aus diesem Verhalten mit Bredt, dass es nach Schilddrüseneinwirkung auf Anurenlarven stets erst zu vorbereitenden Umwandlungen in den thyroxinempfindlichen Geweben kommt, bevor sich sichtbare Auswirkungen der Schilddrüsenbehandlung an den letzteren einstellen. Diese vorbereitenden Umwandlungen, die unter dem

direkten Einfluss des Thyroxins in Gang gesetzt und in Abhängigkeit von seiner Dosierung beschleunigt werden, sind offenbar ebenso regionalspezifischer Natur wie die in der Folge eintretenden sichtbaren Auswirkungen der Schilddrüsenbehandlung.

Die Existenz einer Latenzzeit des sichtbaren Thyroxinreiz-Erfolges selbst bei Anurenlarven, die sich schon bei Behandlungsbeginn in reaktionsbereitem Zustande befanden, zwingt somit zur Schlussfolgerung, dass das Thyroxin seine morphogenetischen Wirkungen über verschiedene Zwischenreaktionen und Zwischenprodukte ausübt. Wenn das in den Larvenkörper eingedrungene Thyroxin mit seinen Reaktionsorten, die in den Zellen des reaktionsfähigen Erfolgsorganes lokalisiert sind, in Kontakt tritt, dann setzt es offenbar durch eine uns noch unbekannte Primärwirkung eine Kette von chemischen und physikalisch-chemischen Prozessen in Gang, in deren Verlauf spezifische Stoffe im Erfolgsorgan aufgebaut oder mobilisiert werden, die für dessen Abbau, Entwicklungsbeschleunigung oder Umgestaltung unmittelbar verantwortlich sind.

Aus den histologischen Untersuchungen von Bredt (1933) geht hervor, dass das Thyroxin die autolytische Auflösung der transitorischen Körpersubstanz einleitet und beschleunigt, aber keine Phagozyten mobilisiert. Auch im histologischen Bild des normalen Schwanzstammabbaus lassen sich keine mobilen Zellen beobachten, die den Abtransport der Gewebstrümmer besorgen (Kremer, 1927). Die unsichtbaren Auswirkungen, die das Thyroxin an den reaktionsfähigen transitorischen Geweben zeitigt, bestehen demnach wohl in erster Linie in der Aktivierung oder Bildung jener Fermente, die zum massiven Abbau der Körpersubstanz befähigt sind. Nach Steppuhn und Mitarbeitern (1926) ist im Autolyse-Versuch eine Denaturierung der Proteine durch eintretende Säuerung (Anhäufung von H^+ an den Grenzschichten) als Vorbedingung einer ausgiebigen fermentativen Spaltung der Körpersubstanz anzunehmen. Wenn nun in entsprechender Weise die Tätigkeit der proteolytischen Fermente in der Amphibienmetamorphose erfolgte, dann müsste im Verlaufe der Umwandlung in den autolytisch zerfallenden transitorischen Körperbereichen eine Verschiebung der aktuellen Reaktion der Gewebsflüssigkeit in den schwach sauren pH-Bereich hinein stattfinden (Auftreten einer lokalen Azidosis). Aleschin (1926) konnte in der Tat zeigen, dass die Wasserstoff-

jonenzahl der Gewebsflüssigkeit während der Anurenmetamorphose von 7,1 auf 6,1 absinkt. Aus der Untersuchung von HELFF (1932) geht ferner hervor, dass sich der Zustand der Azidosis mit fortschreitendem Metamorphoseablauf über den ganzen Organismus auszubreiten beginnt.

Während die unsichtbaren Auswirkungen der Thyroxinbehandlung in den transitorischen Körperbereichen zu einer Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichtes von der Assimilation zur Dissimilation führen, erwirken sie in den Anlagen der adulten Organe keine totale Umstellung des Stoffwechselgeschehens, denn sie führen ja lediglich die Beschleunigung von Prozessen (Entwicklung der Extremitäten- und Zungenanlage) herbei, die an sich schon mit geringer Intensität verlaufen. Die durch eine definierte Thyroxindosis ausgelösten vorbereitenden Umwandlungen werden daher offenbar in den Anlagen der ansprechenden Adultorgane weniger Zeit in Anspruch nehmen als in den thyroxinempfindlichen transitorischen Körperbezirken, mit anderen Worten, die Adultorgane werden rascher mit „Metamorphose" auf einen definierten Thyroxinreiz ansprechen als die transitorischen Bezirke. Da nach NAKAMURA kein kausaler Zusammenhang zwischen aufbauenden und resorptiven Prozessen in der Anurenmetamorphose besteht, würde sich somit in der eben dargelegten Weise erklären lassen, weshalb sich der Einfluss der Thyroxinbehandlung an Kaulquappen stets zuerst an den Anlagen der Adultorgane und erst nachträglich an den transitorischen Körperbezirken sichtbar abzuzeichnen beginnt.

Wenn wir den regionalen Ablauf des Metamorphose-Induktionsvorganges bei Larven, die in reaktionsfähigem Zustand unter den Einfluss überschwelliger Thyroxin-Aussenkonzentrationen gelangen. überblicken, so lassen sich somit stets zwei charakteristische Phasen (siehe Fig. 11) desselben voneinander unterscheiden.

1. Die Vorbereitungsphase (λ), die gleich der Zeitspanne zwischen dem Primärerfolg des Thyroxins und dem regionalen Metamorphose-Start im Zeitpunkt A_m ist.

2. Die Phase der Metamorphose-Reaktion (m), die gleich der Zeitspanne zwischen dem deutlich erkennbaren Einsetzen der Metamorphose-Reaktion und dem natürlichen oder katastrophalen Abbruch des Reaktionsablaufs im Zeitpunkt A_t ist.

Befinden sich die unter den Einfluss des Thyroxins gelangenden Larven bei Behandlungsbeginn in reaktionsbereitem Zustand, so ist die Vorbereitungsphase einer bestimmten Metamorphose-Reaktion praktisch gleich der regionalen Latenzzeit (L), da ja anzunehmen ist, dass das Thyroxin fast unmittelbar nach Behandlungsbeginn an den ansprechenden Geweben zur Wirkung gelangt. Diese Identität zwischen Vorbereitungsphase und regionaler Latenzzeit gilt — wie wir später eingehend darlegen werden — natürlich niemals dann, wenn die Thyroxinbehandlung vor dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft einsetzt.

5. *Die Konzentrationsabhängigkeit der Thyroxinwirkung und ihre Interpretation.*

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass die metamorphoseauslösende Wirkung des Thyroxins in spezifischer Weise von dessen Dosierung abhängt. Der Befund, dass es durch progressiv abgestufte Thyroxindosierung gelingt, selektiv die thyroxinempfindlicheren Körperbereiche der Anurenlarve zur Metamorphose-Reaktion zu veranlassen und Teilmetamorphosen verschiedensten Ausmasses zu erzeugen (Fontès und Aron, 1929; Etkin, 1935) spricht für die Existenz differentieller Reaktionsschwellen („limiti differenziali del minimo efficace" nach Schreiber, 1934; „critical threshold of induction" nach Needham, 1942) der auf den Thyroxinreiz ansprechenden Körperpartien der Kaulquappe. Dabei verstehen wir unter der Reaktionsschwelle diejenige minimale Thyroxindosis (Dosis = Thyroxin-Aussenkonzentration × Behandlungsdauer), die bei definierten Aufzuchtbedingungen gerade noch eine sichtbare Induktionswirkung am Erfolgsorgan zu erzeugen vermag. Die Untersuchungen von Fontès und Aron (1929), von Champy und Radu (1931), sowie diejenigen von Allen (1932), zeigen ferner, dass die Thyroxinwirkung bei Anurenlarven keineswegs dem „Alles oder Nichts-Gesetz" („phénomène du tout ou rien" der französischen Autoren) gehorcht. Der optimale Thyroxineffekt stellt sich nicht unmittelbar nach dem Ueberschreiten der Reaktionsschwelle, sondern erst allmählich mit weiterhin ansteigender Thyroxin-Aussenkonzentration ein. Nach der präzisen Analyse von Etkin (1935) ist die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Metamorphose-Ereignisse bei thyroidektomierten Kaulquappen

einsetzen, keine lineare Funktion der im Dauerbad verabreichten Thyroxin-Aussenkonzentration. Es ergeben sich stets gekrümmte Wirkungskurven, die man nach CHAMPY und RADU mit denjenigen chemischer Katalysatoren vergleichen kann: „Ce sont là les caractères essentiels des courbes d'action d'un catalyseur sur une réaction chimique à vitesse variable".

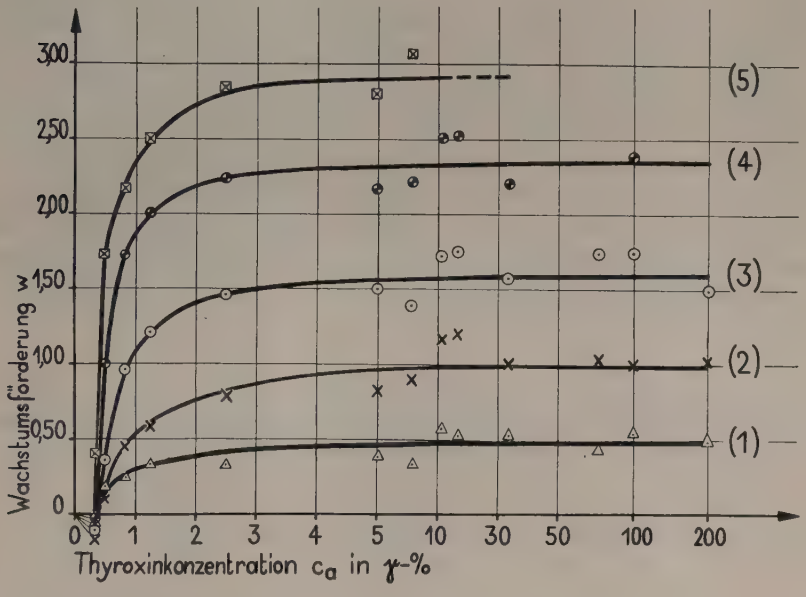


FIG. 12.

Konzentrationsabhängigkeit der Thyroxinwirkung im Kaulquappen-Versuch. Wirkungskurven ermittelt nach 32- (1), 77- (2), 101- (3), 150- (4) und 195- (5) stündiger Behandlung bei 22,5°C.

Zur präzisen Ermittlung der Wirkungskurven untersuchte ich den Einfluss verschiedener Thyroxin-Aussenkonzentrationen auf reaktionsbereite Larven von *Rana temporaria*. Die stets im Dauerbad applizierte Thyroxin-Aussenkonzentration variierte innerhalb der Löslichkeitsgrenze des Thyroxins im Kaulquappen-Versuch (siehe S. 11).

In Fig. 12 gelangt die thyroxinbedingte Wachstumsförderung der Hinterextremitätenanlagen in Abhängigkeit von der Thyroxin-Aussenkonzentration zur Darstellung (Dosis-Effektkurven für verschiedene Behandlungszeiten). Die ersten wachstumsbeschleu-

nigenden Wirkungen des applizierten Thyroxins machen sich nach einer Expositionszeit von 1,3 bis 8 Tagen (22,5° C) zwischen $c_a = 0{,}33$ und 0,50 γ-% bemerkbar. Mit weiter anwachsender Thyroxin-Aussenkonzentration nimmt die Wachstumsförderung zunächst rapid zu, um dann immer langsamer ansteigend einem Maximalwert w_{max} zuzustreben. Der Betrag dieses Maximalwertes hängt von der jeweils gewählten Expositionszeit ab. Wie aus Tab. II ersichtlich ist, nimmt die maximale Wachstumsförderung direkt proportional zur Behandlungszeit zu (w_{max}/t = constans). Von der Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 5$ γ-% (= 1: 20'000'000) an vermag ein weiterer Konzentrationsanstieg praktisch keine weitere Zunahme der Wachstumsförderung mehr zu bewirken. Die maximale Wachstumsförderung bleibt bis zur Erreichung der Löslichkeitsgrenze des Thyroxins, die im Kaulquappen-Versuch bei ungefähr 500 γ-% (in Fig. 12 nicht mehr dargestellt) liegt, erhalten.

Tabelle II.

Abhängigkeit zwischen Behandlungszeit und maximaler Wachstumsförderung der Hinterextremitätenanlage (vergl. Fig. 12).

Behandlungszeit t in Stunden	Maximale Wachstumsförderung w_{max}	Quotient $\frac{w_{max}}{t}$
32	0,50	0,0156
77	1,00	0,0130
101	1,62	0,0160
150	2,38	0,0159
195	3,00	0,0154

Einen den Dosis-Effektkurven entsprechenden Verlauf zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Vorbereitungsphase (siehe Fig. 14).

Der allgemeine Verlauf der Wirkungskurven des Thyroxins ist durch das Fehlen eines Wendepunktes und durch die Einstellung eines konstant bleibenden Grenzwertes gekennzeichnet. Eine Hemmung der Thyroxinwirkung bei massiven Thyroxinkonzentrationen, wie sie von Allen (1932) vermutet worden ist (Allen'sche Optimumkurve) kann in dem von mir untersuchten Konzentrationsintervall zwischen 0 und 500 γ-% nicht beobachtet werden.

Würde sich diese Hemmung erst bei einer höheren Thyroxin-Aussenkonzentration bemerkbar machen, so wäre sie für uns bedeutungslos, da sich die zu ihrem Nachweis erforderlichen Konzentrationen im Kaulquappen-Versuch als unbeständig erweisen (siehe Abschnitt I).

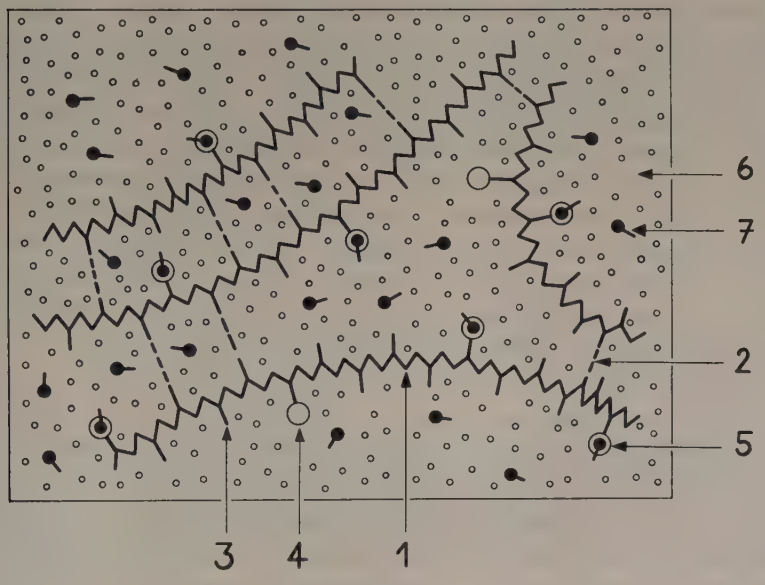


Fig. 13.

Modell der Cytoplasma-Feinstruktur thyroxinbehandelter Anurenlarven. 1 = Polypeptidkette des Proteinfadens; 2 = Brückenverbindung zwischen den Proteinmolekülen; 3 = Seitenast der Polypeptidkette; 4 = unbesetzter Reaktionsort des Thyroxins; 5 = mit Thyroxinmolekül besetzter Reaktionsort, 6 = korpuskulares System des Cytoplasmas (Wasser-Lipoid- und Triglyzeridmolekel); 7 = im korpuskularen System freibewegliches Thyroxinmolekül.

Die Dosis-Effektkurven des Thyroxins lassen sich wie diejenigen des Heteroauxins bei der Pflanze (Sutter, 1944) durch die Annahme deuten, dass der in den Organismus eingedrungene Wirkstoff an seinen im Cytoplasma verankerten Reaktionsorten adsorbiert zur Wirkung gelange (Adsorptionshypothese der Thyroxinwirkung). Mit steigender Thyroxin-Aussen- resp. Thyroxin-Innenkonzentration und damit wachsender Besetzung der Reaktionsorte mit Thyroxinmolekeln nimmt die Wirkung zunächst sehr stark zu. Bei einer bestimmten Thyroxin-Aussenkonzentration

ist die Konzentration der Thyroxin-Innenlösung aber so gross geworden, dass in allen Reaktionsorten Thyroxinmolekel eingelagert sind (Sättigungszustand), sodass ein weiterer Konzentrationsanstieg keine weitere Förderung der Thyroxinwirkung mehr zu erzeugen imstande ist.

Die mathematische Analyse der Wirkungskurven des Thyroxins erfordert eine Vertiefung der Vorstellungen, die wir eben entwickelt haben. In Fig. 13 gelangt ein vereinfachtes Modell der Cytoplasma-Feinstruktur einer Larve, die unter dem Einfluss des Thyroxins steht, zur Darstellung. Nach den Untersuchungen von W. J. Schmidt und A. Frey-Wyssling baut sich das Cytoplasma aus zwei verschiedenen Systemen auf: aus dem retikulären und dem korpuskularen System. Das retikuläre System besteht aus den fadenförmigen Proteinmolekeln, die, an zahlreichen Stellen durch Brücken miteinander verknüpft, ein labiles Gelgerüst bilden. Das korpuskulare System, das das labile Gelgerüst des Cytoplasmas umspült, besteht aus Wasser (= Dispersionsmittel), Jonen, Lipoidmolekülen, Triglyzeridmolekeln und den freibeweglichen Wirkstoffmolekeln. Die Reaktionsorte des Thyroxins und diejenigen anderer Wirkstoffe sind offenbar im retikulären System, wahrscheinlich an den Seitenästen der Polypeptidketten lokalisiert. Zwischen den im Gelgerüst verankerten Reaktionsorten und dem korpuskularen System findet ein stetiger Austausch von Wirkstoffmolekülen statt. Ein Teil der freibeweglichen Thyroxinmolekel tritt mit unbesetzen Reaktionsorten in Kontakt und wird adsorptiv gebunden; gleichzeitig verlassen adsorbierte Thyroxinmoleküle verschiedene Reaktionsorte und kehren in das korpuskulare System zurück.

Mit Hilfe der Adsorptionshypothese lässt sich eine quantitative Beziehung zwischen Thyroxin-Aussenkonzentration und Latenzzeit herleiten, die anhand der experimentell ermittelten Wirkungskurven auf ihre Richtigkeit hin geprüft werden kann. Der mathematischen Herleitung dieser Beziehung kann die von Freundlich (1922) aufgestellte Gleichung der Adsorptionsisotherme nicht zugrundegelegt werden, da diese lediglich als empirische Interpolationsformel zu bewerten ist, die nur in beschränktem Umfange den Adsorptionsvorgang zu beschreiben vermag (vergl. Hoeber, 1947). Wir versuchen aus diesem Grunde die Lösung der gestellten

Aufgabe mit Hilfe eines von der FREUNDLICH'schen Beziehung unabhängiggen, relativ einfachen Ansatzes [1].

Zur Durchführung der nachfolgenden Ableitung seien folgende Voraussetzungen erfüllt: 1. Die Versuchstiere stehen unter dem dauernden Einfluss einer konstant gehaltenen Thyroxin-Aussenkonzentration c_a; der durch Thyroxinaufnahme und eventuell Thyroxininaktivierung verursachte Thyroxinverlust der Aussenlösung lasse sich durch periodische Erneuerung der Badeflüssigkeit kompensieren. 2. Zwischen der Thyroxin-Aussenlösung und der Thyroxin-Innenlösung stelle sich nach relativ kurzer Behandlungszeit ein Permeationsgleichgewicht ein. 3. Die nach Einstellung der Permeationsgleichgewichtes von einem Individuum total aufgenommene Thyroxinmenge sei direkt proportional zur verabreichten Thyroxinkonzentration $c = c_a$.

Es sollen ferner bedeuten:

N = die Zahl der in der Volumeinheit des reagierenden Materials enthaltenen Reaktionsorte des Thyroxins,

n = die Zahl der pro Volumeinheit reagierendes Material aufgenommenen Thyroxinmolekel, und

Z = die Zahl der je mit einem Thyroxinmolekül besetzen Reaktionsorte pro Volumeinheit.

Die Zahl der pro Volumeinheit aufgenommenen Thyroxinmoleküle setzt sich stets aus zwei verschiedenen Anteilen zusammen: Erstens den im korpuskularen System des Cytoplasmas freibeweglichen Thyroxinmolekeln (T) und den an den Reaktionsorten (R) adsorptiv gebundenen Thyroxinmolekülen (TR). Infolge Voraussetzungen (1) und (2) stellt sich schon nach relativ kurzer Behandlungszeit ein Adsorptionsgleichgewicht

$$T + R \rightleftarrows TR$$

ein.

dZ/dt ist die Zahl derjenigen Thyroxinmolekel, die in der Zeiteinheit an den Reaktionsorten adsorbiert werden; dZ'/dt sei gleich der Zahl der in der Zeiteinheit die Reaktionsorte verlassenden Thyroxinmoleküle. Für das Adsorptionsgleichgewicht muss dann die Bedingung

$$dZ/dt = dZ'/dt \qquad (1)$$

erfüllt sein.

Die Zahl der Thyroxinmoleküle, die in der Zeiteinheit mit den Reaktionsorten in Kontakt treten, ist offenbar umso grösser, je beträchtlicher die in den Organismus eingedrungene Thyroxinmenge, resp. infolge Voraussetzung (3) je grösser die Thyroxin-Aussenkonzentration c_a ist:

$$dZ/dt \sim c_a \qquad (2)$$

Sie kann aber nicht beliebig grosse Werte annehmen, da pro Volumeinheit

[1] Für die fachmännische Beratung bei der Aufstellung dieses Ansatzes möchte ich Herrn PD. Dr. H. Kuhn bestens danken.

reagierendes Material nur eine begrenzte Zahl von Reaktionsorten zur Verfügung steht. dZ/dt weist demnach einen umso grösseren Betrag auf, je grösser die Zahl der jeweils noch unbesetzten Reaktionsorte ist:

$$dZ/dt \sim (N\text{-}Z) \quad . \tag{3}$$

Für die Zahl der Thyroxinmolekel, die in der Zeiteinheit an den Reaktionsorten adsorbiert werden, kann somit der Ausdruck

$$dZ/dt = k \cdot (N\text{-}Z) \cdot c_a \tag{4}$$

(k = Proportionalitätskonstante) angesetzt werden.

Es ist anzunehmen, dass in der Zeiteinheit umso mehr adsorbierte Thyroxinmoleküle die Reaktionsorte verlassen und ins korpuskulare System zurückkehren, je mehr Reaktionsorte bei einer bestimmten Thyroxinkonzentration im Durchschnitt besetzt sind:

$$dZ'/dt = k' \cdot Z \tag{5}$$

(k' = Proportionalitätskonstante).

Mit G. (1), (4) und (5) erhalten wir für das Adsorptionsgleichgewicht die Beziehung

$$k\,(N - Z) \cdot c_a \quad - k'Z = 0 \tag{6}$$

Daraus ergibt sich für die durchschnittliche Zahl der Reaktionsorte, die nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes pro Volumeinheit mit Thyroxinmolekeln besetzt sind, der Ausdruck

$$Z = \frac{N \cdot c_a}{c_a + \frac{k'}{k}} \tag{7}$$

Wenn das Thyroxin in adsorptiver Bindung an seinen Reaktionsorten zur Wirkung gelangt (Adsorptionshypothese der Thyroxinwirkung), dann wird eine bestimmte Metamorphose-Reaktion im Thyroxin-Versuch umso rascher einsetzen und ablaufen, je mehr Reaktionsorte pro Volumeinheit reagierendes Material mit Thyroxinmolekeln besetzt sind. Die Vorbereitungsphase λ resp. Latenzzeit muss somit umgekehrt proportional zur Besetzungszahl Z gesetzt werden.

$$\lambda = \frac{f}{Z} \tag{8}$$

(f = Proportionalitätskonstante). Werden die Konstanten k und k' zu $K = k'/k$ zusammengefasst, dann erhalten wir mit Gl. (7) und (8) für die Konzentrationsabhängigkeit der Vorbereitungsphase die Beziehung.

$$\lambda = \frac{f}{N}\left(1 + \frac{K}{c_a}\right) \tag{9}$$

In der deduzierten Beziehung zwischen Thyroxin-Aussenkonzentration und Vorbereitungsphase [Gl. (9)] nimmt die Latenzzeit bei der Thyroxinkonzentration $c_a = 0$ den Wert $\lambda\,(0) = \infty$ an, was besagt, dass die Reaktion auf den Thyroxinreiz bei unendlich starker Verdünnung der Thyroxin-Aussenlösung überhaupt nicht ein-

setzt. Steigt die Thyroxin-Aussenkonzentration von Null an kontinuierlich an, dann vermindert sich die Latenzzeit zunächst sehr stark, um dann, immer langsamer abnehmend, einem Minimalwert $\lambda_{min} = f/N$ zuzustreben, der theoretisch erst bei unendlich hoher Thyroxin-Aussenkonzentration erreicht wird [$c_a = \infty : \lambda\ (\infty) = = \lambda_{min} = f/N$]. Führen wir λ_{min} in Gl. (9) ein, dann gilt

$$\lambda = \lambda_{min} \left(1 + \frac{K}{c_a}\right) . \qquad (10)$$

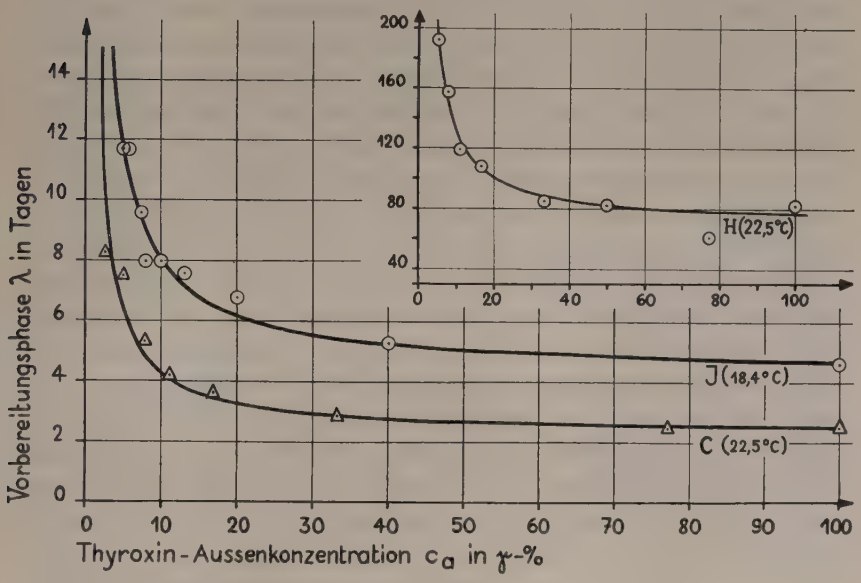


Fig. 14.

Konzentrationsabhängigkeit der Latenzzeit des oberen Hornkiefers (C), des Schwanzstammes (J) und des linken Operkulums (H)[1] bei *Rana temporaria*. Kurvenverlauf nach Gleichung (10), S. 53, berechnet.

Der Grenzwert der Latenzzeit ist umso grösser, je kleiner N, d. h. die Zahl der in der Volumeinheit des reagierenden Materials enthaltenen Reaktionsorte ist. Der Kurvenverlauf weist keinen Wendepunkt auf.

Die experimentelle Prüfung von Gl. (9) resp. Gl. (10) wurde an den Reaktionen des Hornkiefers, des Operkulums und des Schwanzstammes vorgenommen. In Fig. 14 lassen sich experimenteller und nach der Theorie berechneter Kurvenverlauf miteinander ver-

[1] Vorbereitungsphase in Stunden aufgetragen.

gleichen. Aus der Darstellung geht hervor, dass die unter Zugrundelegung der Adsorptionshypothese abgeleitete Beziehung zwischen Thyroxin-Aussenkonzentration und Vorbereitungsphase den beobachteten Kurvenverlauf richtig zu beschreiben vermag. Die aus den Thyroxinversuchen erschlossenen Latenzzeiten streuen nur geringfügig und unsystematisch um die berechneten Kurvenpunkte.

Abschliessend möchte ich mich in diesem Zusammenhange in aller Kürze mit dem Problem der Reaktionsschwellen auseinandersetzen. Auf Grund der Vorstellungen, die wir über die Wirkungsweise des Thyroxins entwickelt haben, muss angenommen werden, dass beliebig kleine Thyroxin-Aussenkonzentrationen, die von Null verschieden sind, reaktionsbereite Anurenlarven beeinflussen können; denn theoretisch müsste ja ein einziges Thyroxinmolekül, das dauernd mit demselben Reaktionsort oder alternierend mit verschiedenen Reaktionsorten in Kontakt tritt, einen Reaktionsanlauf von geringster Intensität im Erfolgsorgan provozieren. Wie ich früher dargelegt habe, sprechen andererseits die experimentellen Befunde dafür, dass sich sichtbare Auswirkungen der Thyroxinbehandlung erst bei Applikation einer minimalen, jeweils spezifischen Dosierung, der Schwellendosis, am peripheren Erfolgsorgan einstellen können. Die Existenz differenzieller Reaktionsschwellen würde somit bedeuten, dass die unsichtbaren vorbereitenden Prozesse, stets ein minimales — durch die Schwellendosis gerade noch erzielbares — Ausmass erfahren müssen, damit sich in der Folge auch eine sichtbare Induktionswirkung am Erfolgsorgan einstellen kann.

ABSCHNITT III

DAS ZUSTANDEKOMMEN DER FRÜHBEREITSCHAFT DES METAMORPHOSE-REAKTIONSSYSTEMS

A. Charakteristik des Bereitschaftszustandes.

1. *Definition und Nachweis des Bereitschaftszustandes.*

Die Einwirkung überschwelliger Thyroxindosen auf Anuren- und Urodelenlarven allein gewährleistet den morphogenetischen Erfolg des Schilddrüsenreizes noch nicht. Der spezifische Einfluss des

applizierten Thyroxins kann sich selbst bei günstigsten Aufzuchtbedingungen nur dann geltend machen, wenn sich die Erfolgsorgane des Schilddrüsenhormons in reaktionsfähigem Zustande (Bereitschaftszustand) befinden.

Die im vorangehenden Abschnitt entwickelten Vorstellungen über die Induktion der Thyroxinmetamorphose ermöglichen uns eine präzise Definition des Bereitschaftszustandes: Unter der Reaktionsbereitschaft[1] gegenüber dem Thyroxin verstehen wir bei Amphibienlarven jene innere Disposition, die es einer bestimmten Körperpartie unter bestimmten Aussenbedingungen ermöglicht, unmittelbar nach Behandlungsbeginn auf den Thyroxinreiz anzusprechen. Und zwar erfolgt die Antwort auf den hormonalen Reiz stets in dem Sinne, dass sich bei überschwelliger Thyroxindosierung morphologisch erkennbare Wirkungen am Erfolgsorgan erst nach einer Phase innerer Vorbereitung (Vorbereitungsphase) abzuzeichnen beginnen.

Der Nachweis des Bereitschaftszustandes erfolgt mit Hilfe des Induktionstestes, entweder durch Transplantation der zur Testierung gelangenden Körperpartien in ältere, metamorphosierende Individuen, oder durch Schilddrüsenbehandlung der in Betracht kommenden Larvenstadien.

2. *Die Regionalspezifität des Bereitschaftszustandes.*

Die zahlreichen an Anuren- und Urodelenlarven durchgeführten Transplantationsversuche (siehe Abschnitt II, S. 39) haben u. a. gezeigt, dass die in fremde Körperregionen verpflanzten reaktionsfähigen Transplantate während der Metamorphose stets herkunftsgemäss in der ihnen eigenen Weise auf das Schilddrüsenhormon

[1] Vielfach wird hierfür auch das Synonym „Reaktionsfähigkeit" verwendet. Waddington (1932) und Needham (1942) kennzeichnen die Reaktionsbereitschaften gegenüber den morphogenetischen Stimuli durch den allgemeinen Ausdruck „competence". Wir verwenden die Bezeichnung „Reaktionsbereitschaft", da dieser Ausdruck jenen Zustand des Reaktionssystems besser kennzeichnet als „Reaktionsfähigkeit" und die deutsche Uebersetzung von „competence" durch das Wort „Kompetenz" (Lehmann, 1945) nicht ganz das Richtige trifft.

ansprechen. Die Bereitschaft des reagierenden Materials gegenüber dem Schilddrüsenreiz ist somit keine uniforme, sondern eine ausgesprochen regionalspezifische.

Die Regionalspezifität des Bereitschaftszustandes wird keineswegs durch die histologische Struktur der betreffenden Erfolgsorgane bestimmt. So reagieren während der Metamorphose beispielsweise die in den Larvenrumpf transplantierten Schwanzhautfragmente der Kaulquappe herkunftsgemäss mit Histolyse auf das Schilddrüsenhormon, während die in den Kaulquappenschwanz transplantierten Rumpfhautfragmente, ungeachtet ihrer völlig gleichartigen histologischen Beschaffenheit, unter dem Einfluss des Metamorphose-Hormons herkunftsgemäss zur Umwandlung in adulte Rumpfhautstückchen veranlasst werden (Lindeman, 1929). Für die Regionalspezifität des Bereitschaftszustandes ist vielleicht die regionale Feinstruktur des Cytoplasmas ausschlaggebend.

Eingehende Untersuchungen an thyroxinbehandelten und thyroidektomierten Anurenlarven haben gezeigt, dass sich der Bereitschaftszustand gegenüber dem Schilddrüsenhormon nur in ganz bestimmten Körperpartien etabliert („zones sensibles locales" nach Champy und Radu, 1931), die wir als lokale Bereitschaftsfelder dem sich über den ganzen Organismus erstreckenden Wirkungsfeld des Schilddrüsenhormons gegenüberstellen können. Dabei fällt auf, dass sich die Bereitschaftsfelder in erster Linie über die aus dem Ektoderm und dem Entoderm hervorgehenden Organe und Organanlagen erstrecken (Schulze, 1922-1924).

Die spezifischen Bereitschaftsfelder grenzen sich bei der Anurenlarve scharf voneinander ab. In einer bedeutenden Untersuchung konnte Champy (1922 *a*, *b*) zeigen, dass die Trennung zwischen benachbarten Körperterritorien, die elektiv mit mitotischer Aktivität (z. B. die Vorderextremitätenanlage) oder mit Histolyse (z. B. die inneren Kiemen) auf Schilddrüsenstoffe ansprechen, eine solche von Zelle zu Zelle sein kann.

3. *Die Phasenspezifität des Bereitschaftszustandes.*

Die gruppentypische Larvenform der Anuren (Kaulquappe) ist durch eine ausgesprochene Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems ausgezeichnet. Larven von *Rana catesbeiana*, die

unter normalen Lebensbedingungen erst nach 2 bis 3 Jahren metamorphosieren, können durch frühzeitig erfolgende Thyroxinbehandlung schon in der dritten Lebenswoche zu „Fröschen" umgewandelt werden (TRENDELENBURG, 1934). Im Verlauf der Anuren-Normogenese greifen demnach bereits auf relativ früher, bis jetzt noch nicht genau ermittelter Entwicklungsstufe, innere Faktoren in das allgemeine Entwicklungsgeschehen ein, unter deren Einfluss sich die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenreiz in den zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirken konstituiert. Durch diesen Prozess, den wir kurz als Bereitschaftsetablierung kennzeichnen wollen, erlangt das auf embryonaler Stufe determinativ vorbereitete Metamorphose-Reaktionssystem sukzessive seine Funktionstüchtigkeit.

Die Bereitschaftsfelder, die sich auf früher Entwicklungsstufe in der Anurenlarve etablieren, bleiben während eines ausgedehnten Lebensabschnittes erhalten, in normal sich entwickelnden Kaulquappen sicher bis zum Einsetzen der Metamorphoseprozesse. Während der Normalmetamorphose schwindet aber nicht nur die Thyroxinempfindlichkeit in den transitorischen Körperterritorien mit deren zunehmendem Abbau, sondern auch jene Körperbereiche, die in den adulten Organismus übernommen werden (Körperteile mit adulter und larvo-adulter Determination), verlieren ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenhormon. Das an Frösche verabreichte Thyroxin vermag daher weder morphogenetische Wirkungen zu entfalten, noch das Körpergewicht, die Intensität der Oxydationsprozesse und den Glykogenbestand zu verändern (GAYDA, 1922; HUXLEY, 1923; ABDERHALDEN und WERTHEIMER, 1928; HENSCHEL und STEUBER, 1931). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Dauer des Bereitschaftszustandes in thyroidektomierten Larven. Theoretisch bestehen hier zwei Möglichkeiten des Verhaltens: Die thyreopriven Kaulquappen bleiben dauernd, also unter Umständen jahrelang bis zu ihrem Eingehen in reaktionsbereitem Zustand; oder aber ihre Reaktionsfähigkeit auf das Schilddrüsenhormon ist zeitlich begrenzt, sodass die schilddrüsenlosen Larven von einem bestimmten Alter an durch Thyroxinbehandlung nicht mehr zur Metamorphose gezwungen werden können, sich also entsprechend verhalten wie etwa isoliertes Gastrulaektoderm, das seine Reaktionsbereitschaft gegenüber den induzierenden Organisatorsubstanzen nach einer

bestimmten Zeit verliert, ohne dass eine Differenzierung stattgefunden hat (Waddington, 1936; Holtfreter, 1938). Welche der beiden Möglichkeiten der Bereitschaftsfestlegung bei thyroidektomierten Kaulquappen realisiert ist, kann nicht entschieden werden, da uns keine diesbezüglichen Untersuchungen bekannt sind. Wir wissen lediglich, dass thyreoprive Kaulquappen sicher noch während längerer Zeit, nachdem sich die ihnen entsprechenden Kontrolltiere zu Fröschen umgewandelt haben, auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen.

An die vorangehende Betrachtung anschliessend möchte ich einige Begriffe, die sich auf die Phasenspezifität des Bereitschaftszustandes beziehen, präzisieren:

1. Als normogenetischen Bereitschaftsbeginn („point of onset of competence" nach Needham, 1942) definieren wir das auf definierte Aufzuchtbedingungen bezogene Alter A_b, in dem sich die Reaktionsbereitschaft in den zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirken etabliert.
2. Als normogenetisches Bereitschaftsende („point of loss of competence" nach Needham) bezeichnen wir jenes auf definierte Aufzuchtbedingungen bezogene Alter A_b^*, in dem eine bestimmte Körperpartie normal sich entwickelnder Anurenlarven ihre Reaktionsfähigkeit auf den Schilddrüsenreiz verliert.
3. Als normogenetische Bereitschaftsperiode oder sensitive Phase („period of competence" nach Needham) definiere ich den normogenetischen Lebensabschnitt, innerhalb dem sich ein zur Thyroxinempfindlichkeit determinierter Körperbereich der Anurenlarve in reaktionsbereitem Zustand befindet.

4. *Die Artspezifität des Bereitschaftszustandes.*

Innerhalb der Artenreihe der Amphibien ist sowohl die Zahl der spezifischen Bereitschaftsfelder als auch deren Verteilung über die verschiedenen Körperbezirke der Larve bedeutenden Variationen unterworfen. Den höchsten Grad der Ausbildung erfährt das Reaktionssystem des Schilddrüsenhormons in der Formengruppe

der Anuren. Bei deren gruppentypischer Larvenform, der Kaulquappe, erstrecken sich spezifische Bereitschaftsfelder über die Anlagen der Extremitäten und der Zunge, über die Hornkiefer, das Vestibulum oris, das Integument, die Flossensäume, den Schwanzstamm, ev. über das Operkulum, über den Spiraldarm und über eine Reihe weiterer innerer Organe aus. Einen bedeutend geringeren Ausbildungsgrad zeigt das Metamorphose-Reaktionssystem innerhalb des Formenkreises der Urodelen. Bei den Larvenformen der Salamandriden und Ambystomiden etabliert sich die Reaktionsfähigkeit auf das Schilddrüsenhormon nur noch in einigen ausgewählten Körperbereichen wie etwa dem Flossensaum, Integument oder den Kiemen. Im Extremfall der obligat neotenen Proteiden (Proteus, Necturus) gar lassen sich überhaupt keine Körperterritorien nachweisen, die jemals die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Thyroxinreiz erlangen (Huxley und Hogben, 1922; Noble, 1931; Schreiber, 1938).

5. *Bereitschaftszustand und morphogenetische Leistungsfähigkeit.*

Eine vollständige Charakteristik des Bereitschaftszustandes darf nicht übersehen, dass die morphogenetische Leistungsfähigkeit der thyroxinempfindlichen Körperbezirke während der Larvenentwicklung deutliche Veränderungen erfährt. Innerhalb der sensitiven Phase erfolgt die Ausdifferenzierung der zur Reaktionsbereitschaft determinierten Anlagebezirke. Dementsprechend nimmt ihre morphogenetische Leistungsfähigkeit innerhalb der Bereitschaftsperiode mit steigendem Larvenalter zu.

Verschiedene Autoren (Kuhn, 1933; Geigy, 1941 *a*; Roth, 1945) haben festgestellt, dass die durch einen Standard-Thyroxinreiz provozierte Metamorphose einen umso höheren Grad an Vollkommenheit erreicht, je weiter die zur Thyroxinbehandlung gelangenden Larven in ihrer Entwicklung gediehen sind. Zu demselben Ergebnis gelangte ich in eigenen Versuchen, in denen drei stark differierende Kaulquappenstadien (Ausgangsstadium I: Jungkaulquappen mit papillenförmigen Hinterextremitätenknospen; mittlere Totallänge L 1 = 20 mm. Ausgangsstadium II: Mittlere Kaulquappen mit Hinterbeinanlagen, die sich im Stadium der gekerbten Palette befinden; mittlere Totallänge L 1 = 29 mm. Ausgangsstadium III: Aeltere Kaulquappen mit in Ober- und

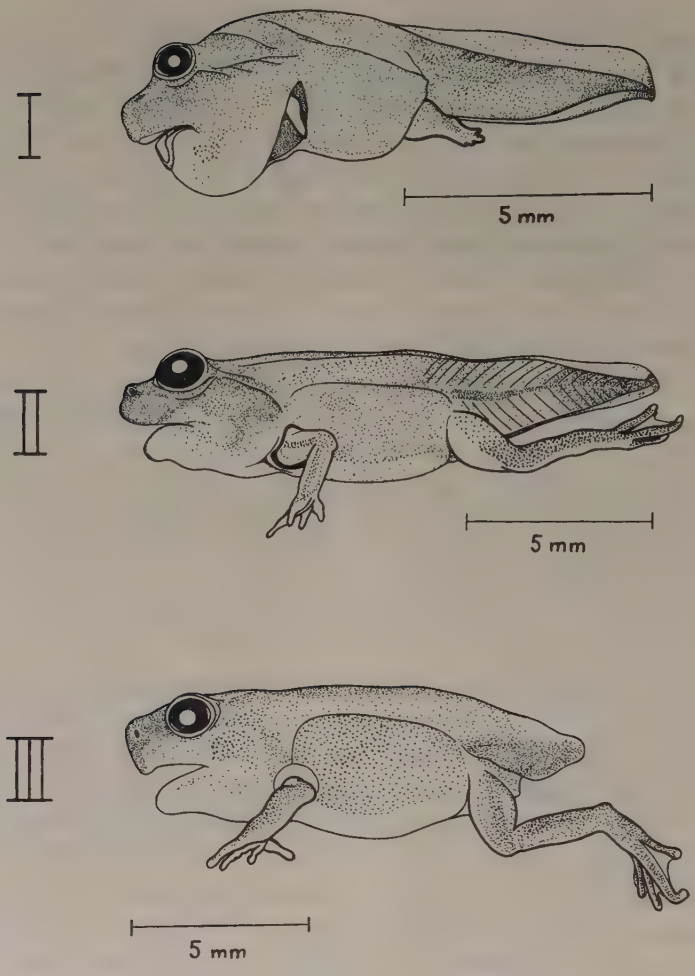


Fig. 15.

Thyroxineinwirkung auf verschiedene Larvenstadien von *Rana temporaria*. Aspekt der Versuchstiere nach 7-tägiger Einwirkung der Thyroxinkonzentration $c_a = 10$ γ-% (I = Behandlungsbeginn im Jungkaulquappenstadium; II = Behandlungsbeginn im Stadium der Kaulquappe mit gekerbten Hinterbeinpaletten; III = Behandlungsbeginn im Stadium der unmittelbar vor der Prometamorphose stehenden Kaulquappe).

Unterschenkel gegliederten Extremitäten; mittlere Totallänge L 1 = 36 mm) unter konstanten Aussenbedingungen einer Thyroxin-Dauerbehandlung durch die Konzentrationen 2 und 10 γ-% unterzogen wurden. Da neben jüngeren und mittleren Kaulquappen auch ältere, unmittelbar vor der Prometamorphose stehende Larven

zur Untersuchung gelangten, schaltete ich den Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität vor Beginn und während der Versuche in allen Versuchs-und Kontrolltieren durch Dauereinwirkung von Tetramethylthioharnstoff (Konz. 1 : 100'000) aus. Fig. 15 zeigt die Auswirkungen der Thyroxinkonzentration 10 γ-% an den Ausgangsstadien I, II und III sieben Tage nach Behandlungsbeginn. Die Versuchstiere, die im Stadium der Jungkaulquappe zur Thyroxinbehandlung gelangt sind, haben sich nach Ablauf des siebten Behandlungstages zu stark missgebildeten, nur entfernt froschähnlichen „Geigenformen" entwickelt, die nicht imstande sind, das Badewasser zu verlassen und rasch an Entwicklungsstörungen (Geigy, 1941 *a*) und an Sauerstoffmangel (Jarisch, 1920) zugrundegehen. Kopf und Rumpf zeigen ödematöse Aufblähungen. Die Körperlängsachse hat auf der Höhe des Rumpfes jene für schilddrüsenbehandelte Frühstadien charakteristische Abknickung in dorso-ventraler Richtung erfahren, die durch eine Krümmung des Rückenmarkes und des Achsenskelettes zustandekommt. Die Spitze des um ca. 50% reduzierten Schwanzstammes zeigt ebenfalls eine leichte Krümmung. Während der ventrale Flossensaum fast vollkommen geschwunden ist, sind beträchtliche Partien des dorsalen Flossensaumes nocht nicht dem Abbau anheimgefallen. Die Augen zeigen einen übernatürlich stark ausgeprägten Exophthalmus. Die in Umwandlung begriffene Nasalregion mit den nur noch schmalen Nasenöffnungen überragt deutlich den Unterkiefer. Vestibulum oris und Hornschnabel sind gänzlich geschwunden. Der stark geweitete und klaffende Mund lässt die in Entwicklung begriffene Zunge erkennen, die als weisses Zäpfchen aus dem Schlund hervorragt. Der larvale Unterkieferknorpel hingegen persistiert und verleiht dem Mund die für thyroxinbehandelte Frühstadien charakteristische T — Form. Die Entwicklungsanläufe an den Extremitätenanlagen stehen im Verhältnis zu den auf diesem Stadium bereits intensiv verlaufenden Rückbildungsprozessen stark im Rückstand. Die missgebildeten Hinterbeinchen haben erst eine Länge von 1,73 mm erreicht und ihre Differenzierung bleibt ebenfalls eine geringfügige. Die Anlagen des Ober- und Unterschenkels sind eben erkennbar geworden und die Ausbildung der Zehen hat eingesetzt. Die linke Vorderextremität ragt als unpigmentiertes Zäpfchen aus dem erst linksseitig zustandegekommenen Resorptionsloch des Operkulums hervor. Bei der mittleren Kaul-

quappe verursacht dieselbe Thyroxinbehandlung bedeutend geringere Störungen im Ablauf und in der Korrelation der regionalen Metamorphoseprozesse. Am siebten Behandlungstag sind die nahezu froschtypisch ausgebildeten Vorderextremitäten beidseitig durch die Operkeln durchgebrochen. Ventral lässt sich das noch nicht mit dem Vorderbein verwachsene Perforationsloch nachweisen. Zwischen den Zehen der in Ober- und Unterschenkel gegliederten Hinterextremität haben sich bereits die Schwimmhäute ausgebildet. Während der dorsale und der ventrale Flossensaum bis auf einen unscheinbaren Rest geschwunden sind, beträgt die Reduktion des Schwanzstammes erst durchschnittlich 67%. Die Augen treten immer noch stärker hervor als bei dem in Fig. 17 dargestellten normalmetamorphosierten Jungfröschchen. Abknickungen der Körperlängsachse auf der Höhe des Rumpfes und des Schwanzstammes, wie wir sie bei den thyroxinbehandelten Frühstadien beobachten, lassen sich bei den Versuchstieren des Ausgangsstadiums II nicht mehr feststellen. Während der larvale Unterkieferknorpel bei den im Stadium der Jungkaulquappe zur Thyroxinbehandlung gelangenden Individuen nach Ablauf des siebten Behandlungstages noch keine Veränderungen zeigt, erfährt er nach derselben Zeit bei der mittleren Kaulquappe eine deutliche Umwandlung, die dem stark geweiteten Mund froschähnliche Gestalt verleiht. Die Versuchstiere, die im Stadium der älteren, unmittelbar vor der Prometamorphose stehenden Kaulquappe unter den Einfluss des Thyroxins gelangenten, haben sich gegen Ende des siebten Behandlungstages zu lebensfähigen, aber noch deutlich unterentwickelten Fröschchen umgewandelt, die auf feuchte Watte kriechen und kleinere Sprünge ausführen. Die Ausbildung der Hinterbeine hält auch auf diesem Behandlungsstadium mit dem allgemeinen Metamorphoseablauf nicht genügend Schritt. Die Resorptionslöcher der Operkeln sind aber hier nicht mehr nachweisbar und das Ausmass des Exophthalmus entspricht ungefähr demjenigen normal metamorphosierter Jungfröschchen. Der Mund hat froschtypische Form angenommen, die Nasalfront hingegen zeigt im Vergleich zu den Normaltieren eine zu schroffe Abplattung. Ventraler und dorsaler Flossensaum sind vollkommen geschwunden und der Schwanzstamm hat sich zu einem Stummel von durchschnittlich 3 mm Länge reduziert (Schwanzstamm-Reduktion = 88%).

Noch viel ausgesprochener kommen die Unterschiede zwischen

den morphogenetischen Leistungen der drei Entwicklungsstadien bei der Applikation schwächerer Thyroxindosen zur Geltung (s. Fig. 16). Die im Jungkaulquappen-Stadium zur Behandlung gelangenden

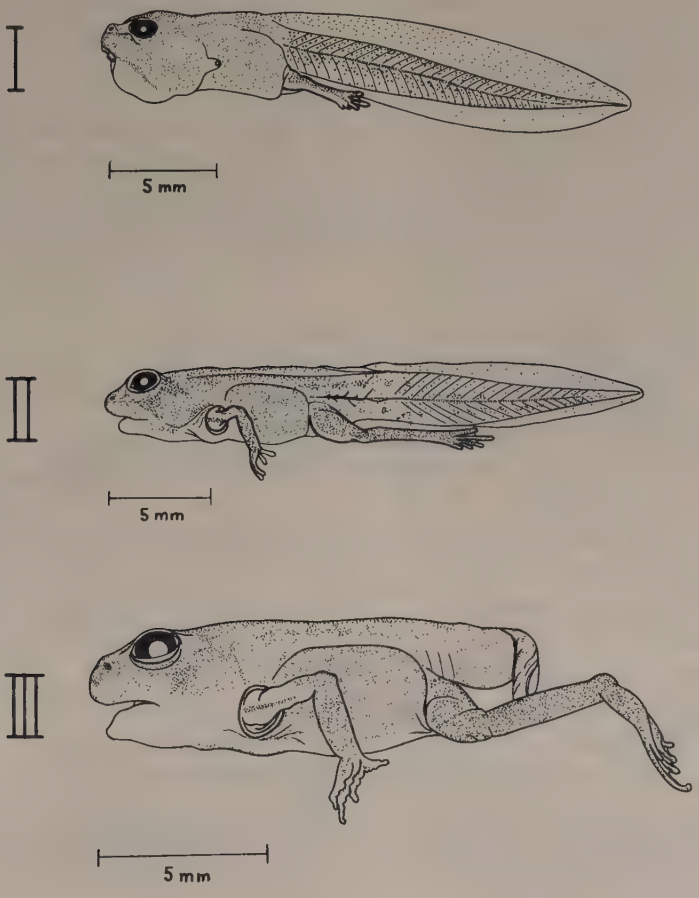


Fig. 16.

Thyroxineinwirkung auf verschiedene Larvenstadien von *Rana temporaria*. Aspekt der Versuchstiere nach 11-tägiger Einwirkung der Thyroxinkonzentration $c_a = 2\ \gamma$-%.

Versuchstiere erfahren nur geringfügige Umwandlungen. Der Flossensaum wird nur unbeträchtlich angegriffen und der Schwanzstamm zeigt überhaupt keine Reduktion. Der Abbau der Ober- und Unterlippe ist verzögert und am Hornschnabel lassen sich lediglich mehr oder weniger starke Defekte nachweisen. Der Atemporus

bleibt intakt und die Augen treten nicht hervor. Lediglich Nasalregion und Hinterextremitätenanlagen lassen unter den äusserlich erkennbaren Körperbereichen deutliche Veränderungen erkennen. Im Gegensatz zum Verhalten der Jungkaulquappen befindet sich die Metamorphose bei der mittleren Kaulquappe in vollem Gang. Die froschtypisch ausgebildeten Vorderbeine sind beidseitig durch die Resorptionslöcher der Operkeln hindurch nach aussen gelangt. Die Hinterextremitäten befinden sich in rapidem Wachstum. Lippen und Hornschnabel haben eine vollständige Reduktion erfahren. Der Mund ist geweitet und hat froschähnliche Gestalt angenommen. Die Augen treten deutlich hervor. Ventraler und

Fig. 17.
Normal metamorphosierter Jungfrosch von *Rana temporaria*.

dorsaler Flossensaum befinden sich in intensiver Rückbildung; die Reduktion des Schwanzstammes hingegen beträgt erst ungefähr 18%. Die im Stadium der älteren Kaulquappe unter den Einfluss der Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 2\,\gamma$-% gelangenden Individuen haben sich nach Ablauf des 11. Behandlungstages sogar zu weitgehend normal proportionierten Jungfröschchen entwickelt (vergl. mit Fig. 17).

Die Kontrolltiere, die den in Fig. 15 und 16 dargestellten Versuchstieren entsprechen, repräsentieren ausnahmslos den Zustand der intakten Kaulquappe.

Die eigenen Thyroxinversuche, in denen der störende Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität in Versuchs- und Kontrolltieren in hinreichendem Masse ausgeschaltet worden ist, zeigen, in welch starkem Masse sich innerhalb der Bereitschaftsperiode die morphogenetische Leistungsfähigkeit mit dem zunehmenden

Differenzierungsgrad und Alter der Anurenlarve ändert. Die Präzisierung dieses allgemeinen Befundes bleibt einer histologischen Analyse der Versuchstiere vorbehalten.

B. Die Frühlarvale Normogenese von *Rana temporaria* L.

Bevor wir uns der experimentellen Analyse der Bereitschaftsetablierung zuwenden, müssen wir den Normogenese-Verlauf des Untersuchungsobjektes in den für unsere späteren Betrachtungen wichtigsten Punkten präzisieren. Diese einführende Darstellung der Normalentwicklung von *Rana temporaria* wird sich auf die Zusammenstellung einer Normentafel, die quantitative Analyse einiger Teilvorgänge, das Muster und die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese beschränken. Die in ihr enthaltenen morphologischen und biometrischen Angaben beziehen sich stets auf konstante Aufzuchtbedingungen sowie auf genetisch und statistisch einheitliches Ausgangsmaterial. Von ausschlaggebender Bedeutung für die Reproduzierbarkeit des normogenetischen Verhaltens der Larven erwies sich neben der Konstanthaltung der Temperatur, der Zusammensetzung des Badewassers etc., die Konstanthaltung der Individuen-Raumdichte. Es zeigte sich im Verlauf dieser Untersuchung aufs Neue, dass die Entwicklungsgeschwindigkeit in beträchtlichem Masse von der Zahl der Individuen abhängt, die auf ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen verteilt sind (vergl. Bilski, 1921).

1. *Die Stadien der frühlarvalen Normogenese.*

Bis zur Entstehung der typischen Kaulquappe durchläuft die Junglarve eine Reihe charakteristischer Stadien, die bei konstanten Aufzuchtbedingungen in einem jeweils charakteristischen Larvenalter erreicht werden. Die in der nachfolgenden Normentafel enthaltenen Altersangaben beziehen sich stets auf den Fixpunkt der postembryonalen Altersskala, $A_0 = 0$ pe-Stunden [1], sowie auf standardisierte Ausgangs- und Aufzuchtbedingungen. Das Stadium, in dem die Junglarven ihre Eihüllen verlassen, ist starken Variationen unterworfen. In der Regel schlüpfen die Individuen bei *Rana temporaria*, wenn sie Larven-Stadium Nr. 2 (siehe Nor-

[1] „pe" bedeutet „postembryonal".

mentafel) erreicht haben. Unter Umständen verlassen sie die Eihüllen bereits auf Larven-Stadium Nr. 1, d. h. ungefähr einen halben Tag früher. Verschiedene Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass vor allem Temperaturreize für das vorzeitige Ausschlüpfen der Larven massgebend sein können. Infolge der starken Variabilität des Schlüpftermins definieren wir den Fixpunkt der pe-Altersskala als dasjenige Alter, das dem in unserer Normentafel als Larven-Stadium Nr. 1 charakterisierten Entwicklungszustand entspricht.

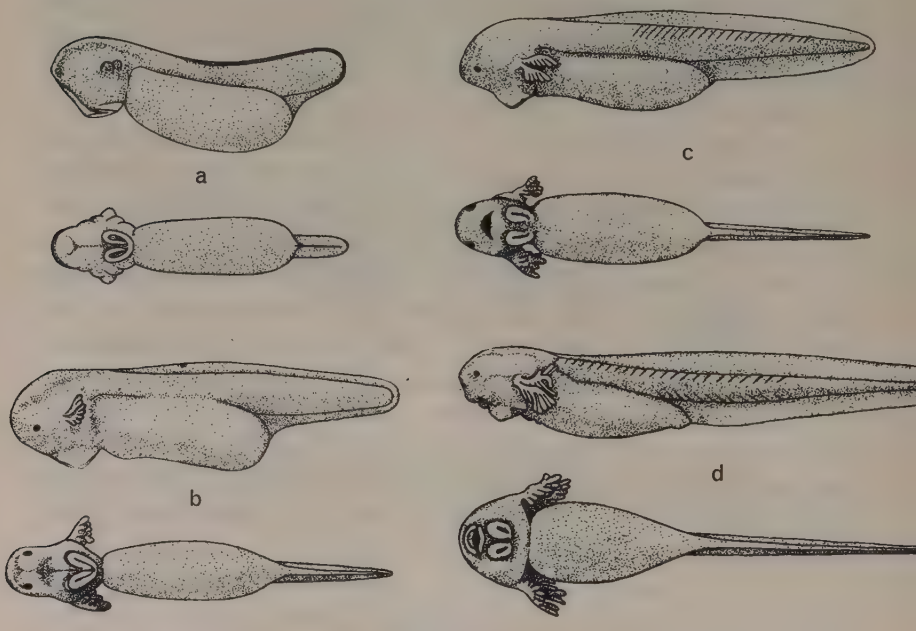


Fig. 18.
Die Stadien der frühlarvalen Normogenese von *Rana temporaria* (Normentafel).
Fig. 18 *a*: LS. 1, 0 pe-St. — Fig. 18 *b*: LS. 2, 12 pe-St. — Fig. 18 *c*: LS. 3, 24 pe-St. — Fig. 18 *d*: LS. 5, 48 pe-St.

Normentafel der frühlarvalen Entwicklung von *Rana temporaria* L.

Aufzuchtbedingungen: 1) Temperatur $t = 20{,}3 \pm 0{,}3°$ C; 2) Individuen-Raumdichte $d_i = 5$ Indiv./45 ccm; 3) Badewasser: Basler Brunnenwasser (pH = 7,02); 4) Ernährung: Bis in das Alter vom 108 pe-Stunden durch autochthone Dotterreserven, darnach dauernde Verfütterung von Brennesselpulver.

Ausgangsmaterial: Frisch geschlüpfte Junglarven aus einem Andermatter-Gelege (Extreme ausgeschaltet).

Legende: LS = Larven-Stadium, LA = Larvenalter in pe-Stunden.

LS	LA	Morphologische Charakteristik
1	0	Frühzeitig geschlüpfte oder schlüpfbereite Junglarve mit einer mittleren Schwanzlänge von ungefähr 1,1 mm; die Anlagen der äusseren Kiemen sind beidseitig als mehr oder weniger scharf konturierte Auswölbungen der Körperdecke erkennbar (Fig. 18 *a*).
2	12	Die zentrale Schwanzpartie weist eine durchschnittliche Länge von 2,5 mm auf und ist ungefähr 0,5 bis 0,6 mal so lang wie die Kopf-Rumpflänge. Die Anlagen des dorsalen und des ventralen Flossensaumes zeichnen sich deutlich vom Schwanzstamm ab. Die Anlagen der äusseren Kiemen haben sich zu 3- bis 8- teiligen feinen Kiemenästchen differenziert. Mundbucht gebildet (Fig. 18 *b*).
3	24	Länge des Schwanzstammes im Mittel 3,9 mm und ca. 0,7 bis 0,8 mal so lang wie Kopf-Rumpflänge. Mund offen (Fig. 18 *c*).
4	36	Länge der zentralen Schwanzpartie durchschnittlich 5,1 mm. Sie ist in diesem Stadium ungefähr gleich lang wie die Kopf-Rumpflänge. Ober- und Unterkiefer angelegt. Der Unterlippenwulst beginnt sich von seinem Untergrund abzuzeichnen.
5	48	Mittlere Länge des Schwanzstammes ungefähr 6,2 mm; sie ist ungefähr 1,4 mal so lang wie die Kopf-Rumpflänge. Die äusseren Kiemen haben den Zustand maximaler Entwicklung nahezu erreicht. Der Rumpf wird infolge der einsetzenden Windungen des Darmes massiver und nimmt, in ventraler Ansicht betrachtet, spindelförmige Gestalt an. Ober- und Unterlippenwulst heben sich deutlich von ihrem Untergrund ab. Der Kopf sondert sich scharf vom Rumpf ab und gleicht sich der Form eines gleichseitigen Dreiecks an. Die Haftdrüse rückt in cephaler Richtung vor (Fig. 18 *d*).

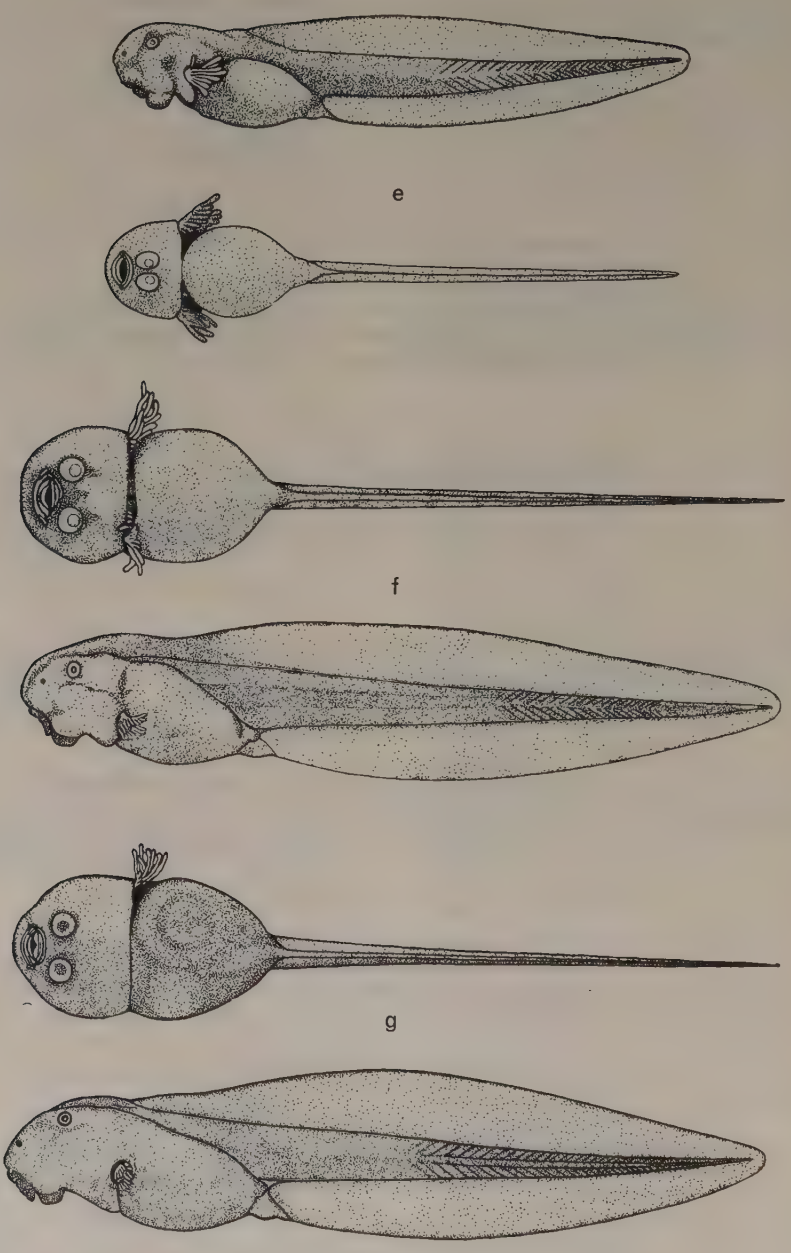


Fig. 18 *e*: LS. 6, 60 pe-St. — Fig. 18 *f*: LS. 7, 72 pe-St. — Fig. 18 *g*: LS. 8, 84 pe-St.

LS	LA	Morphologische Charakteristik
6	60	Mittlere Länge des Schwanzstammes ca. 7,2 mm und ungefähr 1,6 mal so lang wie Kopf-Rumpflänge. Der Rumpf hat rundliche Form angenommen. Die Operkularfalte ist im Begriffe, die äusseren Kiemen zu überwachsen. Die linke und die rechte Hälfte der Haftdrüse haben sich voneinander gesondert und ovoide Gestalt angenommen. Auf der Unterlippe beginnen sich die Anlagen der Kammwülste abzuzeichnen. Die Augen schimmern deutlich durch die durchsichtig gewordene Cornea hindurch (Fig. 18 *e*).
7	72	Mittlere Länge der zentralen Schwanzpartie ca. 7,9 mm. Schwanzstamm ungefähr 1,8 mal so lang wie die Kopf-Rumpflänge. Die Operkularfalte hat noch keine der beiden äusseren Kiemen vollständig überwachsen. Der Abbau der äusseren Kiemen steht unmittelbar bevor. Am Rande der Unterlippe hat sich der Lippensaum gebildet. Die Verhornung der Kieferränder ist äusserlich noch nicht deutlich festzustellen. Die beiden Haftdrüsen sind lateralwärts voneinander abgerückt. Die Hinterextremitätenanlagen erscheinen an der ventralen Ansatzstelle des Schwanzstammes am Rumpf als kleine, noch unscharf von ihrer unmittelbaren Umgebung abgegrenzte Hautauswölbungen (Fig. 18 *f*).
8	84	Mittlere Länge des Schwanzstammes ca. 8,5 mm. Das Längenverhältnis zwischen Schwanzstamm und Kopf-Rumpfpartie ist konstant geblieben. Die rechte äussere Kieme (Ansicht in ventraler Objektlage) ist von der Operkularfalte vollkommen überwachsen, die linke äussere Kieme nur teilweise; ihre distale Partie ragt aus der sich konstituierenden Operkularöffnung hervor. Die Verhornung der Kieferränder kann nun äusserlich festgestellt werden und die an Pigment ärmer werdende Bauchhaut lässt die Darmspirale schwach durchschimmern (Fig. 18 *g*).
9	96	Die zentrale Schwanzpartie weist eine mittlere Länge von ca. 9,1 mm auf. Die linke und die rechte äussere Kieme sind von den Operkularfalten vollständig überwachsen. Auf der linken Seite hat sich der

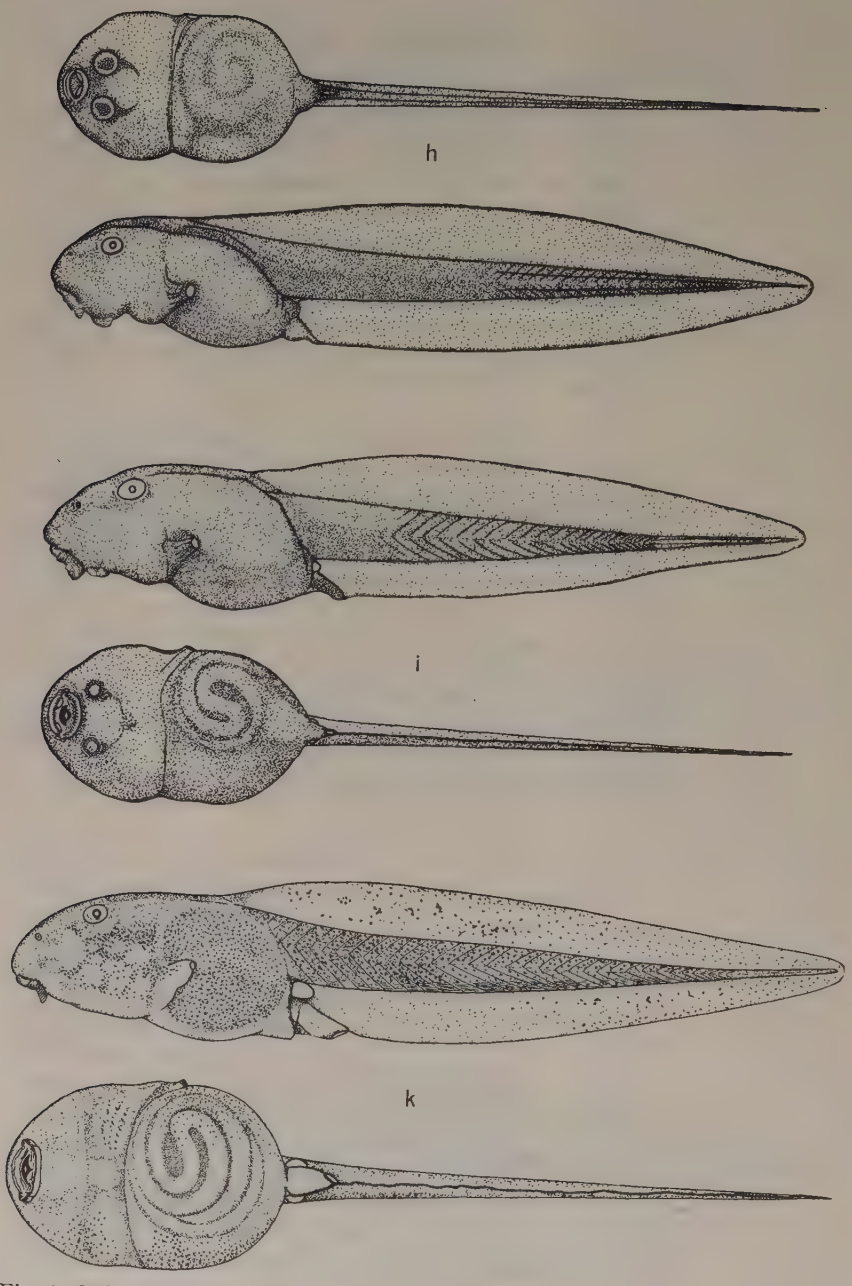


Fig. 18 *h*: LS. 9, 96 pe-St. — Fig. 18 *i*: LS. 10, 120 pe-St. — Fig. 18 *k*: LS. 13, 200 pe-St.

LS	LA	Morphologische Charakteristik
		Atemporus konstituiert. Der Abbau der Haftdrüsen ist in Gang gekommen und auf den Kammplatten erscheinen die ersten Lippenzähnchen. Maximaler Durchmesser der Operkularöffnung L 7 = 0,36 mm (Fig. 18 *h*).
10	120	Mittlere Länge des Schwanzstammes ungefähr 10 mm. Kopf und Rumpf runden sich ab und sind nicht mehr deutlich voneinander abzugrenzen. Ueberreste der Haftdrüsen treten noch deutlich hervor. Analtubus und papillenförmig strukturierte Hinterextremitätenanlage sind nunmehr scharf modelliert und die Darmspirale schimmert deutlich durch die Bauchhaut hindurch. Die typische Jungkaulquappen-Form ist entstanden (Fig. 18 *i*).
11	144	Jungkaulquappe mit einer mittleren Schwanzstammlänge von ungefähr 10,8 mm und einer Hinterextremitätenlänge von ca. 0,3 mm. Haftdrüsen resorbiert. An ihrer Stelle Pigmentverdichtungen.
12	168	Jungkaulquappe. Mittlere Länge der zentralen Schwanzpartie ca. 11,6 mm, Länge der Hinterextremitätenanlagen ca. 0,4 mm.
13	200	Kaulquappe mit Hinterextremitätenanlagen, die die Gestalt eines Zäpfchens aufweisen. Mittlere Länge des Schwanzstammes ca. 12,5 mm, mittlere Hinterextremitätenlänge ungefähr 0,5 mm. Pigmentzellen in grosser Zahl in der Haut nachweisbar (Fig. 18 *k*).

2. *Die biometrische Analyse einiger Wachstums- und Abbauvorgänge der frühlarvalen Normogenese.*

Die hier zur Darstellung gelangenden Wachstums- und Abbauvorgänge beziehen sich auf dieselben Aufzuchtbedingungen, die wir der Normentafel zugrundegelegt haben (Standard-Aufzuchtbedingungen). Fig. 19 zeigt den Wachstumsverlauf der zentralen Schwanzpartie zwischen dem Zeitpunkt, in dem die Junglarven frühestens ihre Eihüllen verlassen (Larven-Stadium Nr. 1) und dem

10. pe-Tag. Bis in das Alter von etwa 108 pe-Stunden erfolgt das Längenwachstum des Schwanzstammes (erfasst durch die Messstrecke L 4) derart gleichmässig, dass die Wachstumskurve in diesem Altersintervall geradezu als Eichkurve für die Altersbestimmung verwendet werden kann. Der Uebergang von der reinen Dotternährung zur aktiven Nahrungsaufnahme, der bei den hier gewählten Aufzuchtbedingungen zwischen dem 4. und 5. pe-Tag stattfindet, ist mit einer deutlichen Erhöhung der Streuung des Wachstumsverlaufs verbunden.

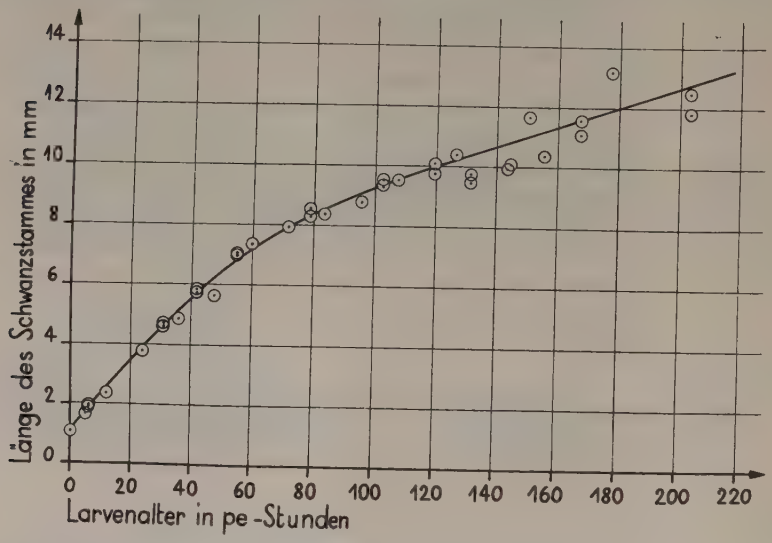


Fig. 19.

Rana temporaria. Längenwachstum der zentralen Schwanzpartie während der frühlarvalen Normogenese (Standard-Aufzuchtbedingungen).

Wie von verschiedenen Autoren (z. B. Doms, 1916) gezeigt worden ist, hängt die Entwicklung der äusseren Kiemen bei der Anurenlarve in starkem Masse von den Aufzuchtbedingungen ab, insbesondere vom Sauerstoffgehalt und von der Temperatur des Badewassers. Der in Fig. 20 veranschaulichte Verlauf des Kiemenwachstums und -abbaus stellt daher ein Verhalten dar, das nur bei Einhaltung der von uns gewählten Standardbedingungen reproduzierbar sein wird. Ferner ist zu beachten, dass zur Darstellung des Kiemenverhaltens Messpunkte verwendet werden mussten, die anhand von fixiertem Material gewonnen wurden. Aus Fig. 20 geht

hervor, dass die Länge der äusseren Kieme (Messtrecke V 1) während den ersten 20 pe-Stunden sehr stark zunimmt, um ungefähr im Alter von 36 pe-Stunden einen Maximalwert zu erreichen, der bis in das Alter von ca. 72 pe-Stunden (Larven-Stadium Nr. 7) erhalten bleibt (Zustand der maximalen Ausbildung der äusseren Kiemen). Nach Ueberschreiten dieses Stadiums setzt der Abbau

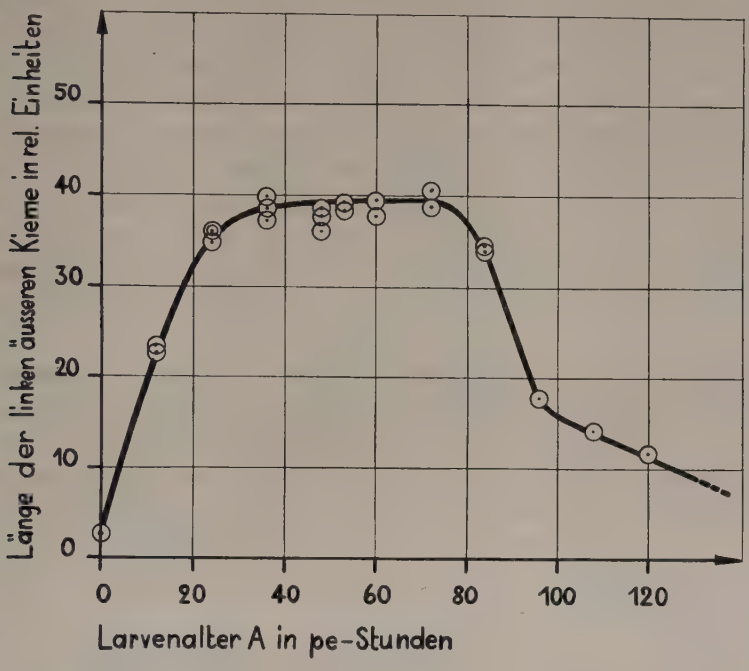


Fig. 20.
Rana temporaria. Wachstum und Abbau der äusseren Kiemen.

der äusseren Kieme ein, um während den folgenden 12 Stunden mit maximaler Intensität zu verlaufen. Im Larvenalter von ungefähr 96 pe-Stunden (Larven-Stadium Nr. 9), d. h. dann, wenn sich das Spirakulum auf der linken Körperseite konstituiert hat, beträgt die Länge der äusseren Kieme nur noch ca. 45% ihres Maximalwertes. Von diesem Zeitpunkt an erfolgt die weitere Reduktion der nun unter den Operkeln verborgenen Reste der äusseren Kiemen mit beträchtlich verringerter Geschwindigkeit, sodass noch in den späten Jungkaulquappen-Stadien dunkel pigmentiere Kiemenreste in der Peribrachialregion nachweisbar sind.

3. *Das Muster der frühlarvalen Normogenese.*

Die verschiedenen Ereignisse der normalen Entwicklung erfolgen stets in einer ganz bestimmten Sukzession, die wir als Normogenese-Muster bezeichnen wollen. Fig. 21 veranschaulicht das Muster der frühlarvalen Normogenese von *Rana temporaria*, das sich bei Einhaltung unserer Standardbedingungen reproduzieren lässt. Eine erste Gruppe von Ereignissen umfasst diejenigen Entwicklungsvorgänge, welche das Zustandekommen der Junglarven-Organisation zur Folge haben. Eine zweite Gruppe von Episoden betrifft jene Entwicklungs- und Abbauvorgänge, die an der Umwandlung der maximal entwickelten Junglarve in die Jungkaulquappe beteiligt sind. Beginn und Verlauf der Kiemenüberwachsung durch die Operkularfalten, Konstitution des Peribranchialraumes und des Atemporus, Abbau der äusseren Kiemen und der Haftdrüsen, Abrundung der Hinterextremitätenknospen etc. Dabei fällt auf, dass der Abbau der äusseren Kiemen erst dann einsetzt, wenn die Operkelüberwachsung bereits beträchtlich fortgeschritten ist. Ferner erkennen wir, dass die linksseitig (Linksseitigkeit bezogen auf Ventrallage des Objektes) erfolgende Operkulation mehr Zeit in Anspruch nimmt als die auf der rechten Körperseite erfolgende Operkelüberwachsung, was offenbar mit der Ausbildung des unpaarigen Spirakulums zusammenhängt. Ausserdem zeigt sich, dass der Abbau der Haftdrüsen erst dann deutlich erkennbar einsetzt, wenn die Reduktion der äusseren Kiemen bereits stürmisch verläuft.

Anhand des in Fig. 21 dargestellten Normogenese-Musters lassen sich drei charakteristische Phasen der frühlarvalen Anurenentwicklung voneinander unterscheiden:

1. Die Junglarvenphase. Sie umfasst die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge, die das Zustandekommen der voll ausgebildeten Junglarve zur Folge haben. Bei Einhaltung der Standardbedingungen, die wir der Normentafel zugrundegelegt haben, erstreckt sich die Junglarvenphase über das Altersintervall zwischen der 0. und der 60. pe-Stunde.
2. Die Uebergangsphase ist durch die Entwicklungs- und Abbauvorgänge gekennzeichnet, die zur Umwandlung

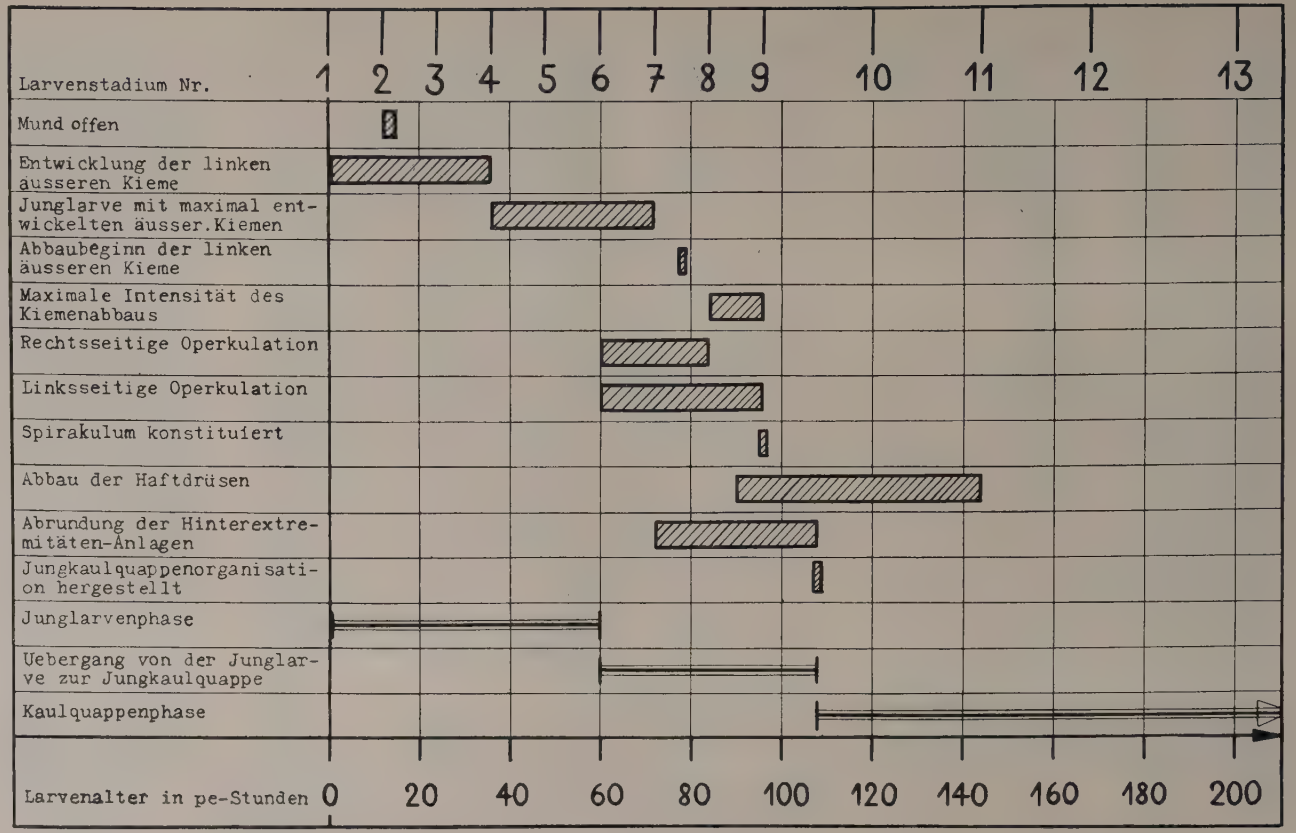


FIG. 21. — *Rana temporaria*. Muster der frühlarvalen Normogenese bei Standard-Aufzuchtbedingungen.

der maximal entwickelten Junglarve in die Jungkaulquappe führen. Die Uebergangsphase erstreckt sich bei Einhaltung unserer Standardbedingungen ungefähr zwischen der 60. und der 108. pe-Stunde.

3. Die Kaulquappenphase („Prämetamorphose-Phase" nach Etkin, 1932) setzt mit dem Zustandekommen der Jungkaulquappen-Organisation ein und erstreckt sich über einen ausgedehnten Abschnitt des larvalen Lebens bis zur beginnenden Prometamorphose, d. h. bis zum Einsetzen des rapiden Hinterextremitäten- und Schilddrüsenwachstums. Die Kaulquappenphase ist durch die langsame und kontinuierliche Entwicklung der Kaulquappenorgane gekennzeichnet.

Bredt (1933) verwendet zur Kennzeichnung der Phase, in der sich die Umwandlung der Junglarve in die Jungkaulquappe vollzieht, den Ausdruck „Prometamorphose". Wir lehnen diese Bezeichnung deshalb ab, weil sie bereits von Etkin (1932-1935) für jene Metamorphosephase vorgeschlagen worden ist, die dem Metamorphose-Klimax der Anuren unmittelbar vorangeht.

Wie bereits von verschiedenen Autoren (Romeis, 1923; Geigy, 1941 *a*, *b*) beobachtet werden konnte, wird die Rückbildung der transitorischen Junglarvenorgane durch Thyroxinbehandlung nicht beeinflusst. In eigenen Thyroxinversuchen, in denen die äusseren Kiemen und Haftdrüsen der Versuchs- und Kontrolltiere fortlaufend ausgemessen wurden, konnte ich mich von der Richtigkeit dieses Befundes überzeugen. Die Rückbildungsprozesse, die während der Umwandlung der Junglarve in die Jungkaulquappe stattfinden, folgen somit einer internen Determination (Geigy, 1941 *b*), in scharfem Gegensatz zu den hormonal kontrollierten Abbauprozessen des Metamorphose-Klimax.

4. *Die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese.*

Die Geschwindigkeit, mit der ein bestimmtes Entwicklungsstadium bei Anuren erreicht wird, hängt in artspezifischer Weise von der Temperatur ab (Moore, 1939). Um die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese von *Rana temporaria* L. abschätzen zu können, wurden frisch geschlüpfte

Junglarven (LS. 1—2) unter Einhaltung der übrigen Standardbedingungen bei verschiedenen Aussentemperaturen aufgezüchtet und jeweils die Entwicklungszeit bestimmt, die bis zum Erreichen des Larven-Stadiums Nr. 9 (Spirakulum konstituiert: maximaler Durchmesser der Operkularöffnung L 7 = 0,363 mm)

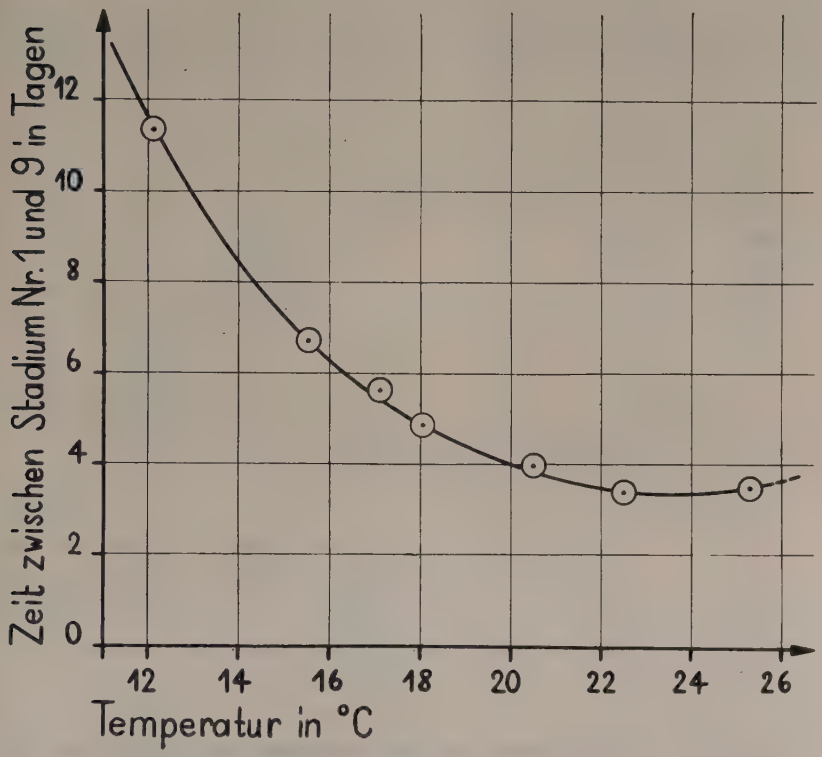


Fig. 22.

Rana temporaria. Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese.

verstreicht. Fig. 22 stellt den erhaltenen Kurvenverlauf im Temperaturintervall zwischen 12,1° und 25,3° C dar. Mit zunehmender Aussentemperatur nimmt die Entwicklungszeit zunächst exponentiell ab, erreicht bei ungefähr 23° C ein Minimum (Temperaturoptimum der frühlarvalen Normogenese), um dann mit weiterhin ansteigender Temperatur wieder langsam anzuwachsen. Die Analyse der Temperaturabhängigkeit nach der Beziehung von

Arrhenius (siehe Fig. 23) ergibt eine kritische Temperatur von ungefähr $t = 22{,}5°$ C ($1/T = 3{,}384 \cdot 10^{-3}$); denselben Wert liefert die Analyse der Temperaturkurve nach der R. G. T.-Regel von Van't Hoff. Im Temperaturintervall zwischen 12° und 20° C ergibt sich ein konstant bleibender Temperaturkoeffizient vom

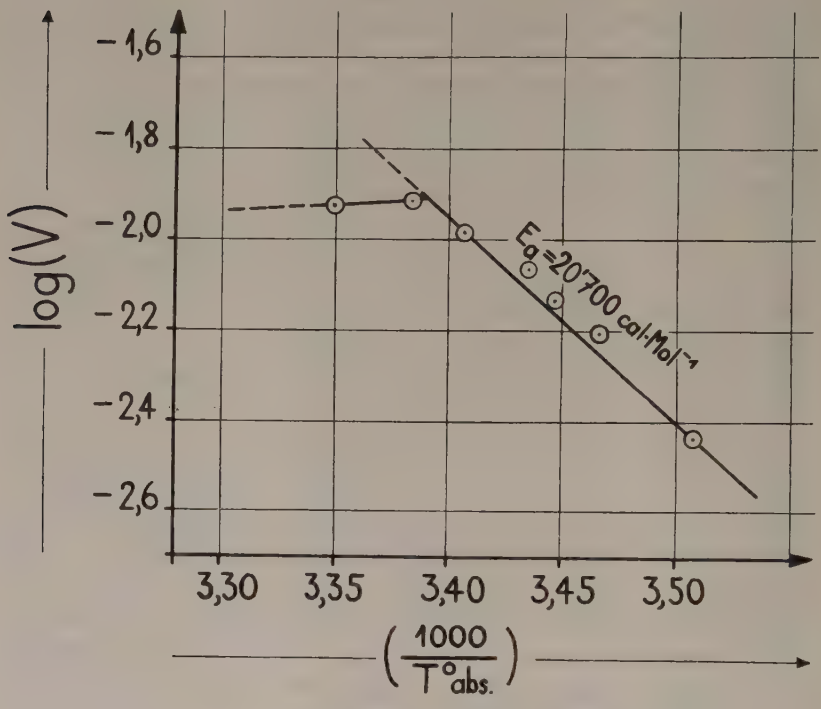


Fig. 23.

Analyse der in Fig. 22 dargestellten Temperaturabhängigkeit nach der Beziehung von Arrhenius (V = „Entwicklungsgeschwindigkeit" = reziproker Wert der Entwicklungszeit, T = absolute Temperatur).

Betrag $Q_{10} = 3{,}5$ resp. eine konstante Aktivierungsenergie von ungefähr $E_a = 21'000$ cal/Mol (genauer Wert: $E_a = 20'700$ cal/Mol). Die an *Rana temporaria* ermittelte Aktivierungsenergie der frühlarvalen Normogenese weicht auffallenderweise nicht sehr stark vom Wert $E_a = 24'000$ cal/Mol ab, den Atlas (1935) im entsprechenden Temperaturintervall zwischen 10° und 20° C an Embryonal- und Larvenstadien von *Rana pipiens* ermittelt hat.

C. Der Normogenetische Bereitschaftsbeginn.

1. *Beginn und Verlauf der Thyroxin-Frühmetamorphose.*

Verschiedene Autoren haben das Entwicklungsstadium festzuhalten versucht, in dem sich die Reaktionsfähigkeit auf das Schilddrüsenhormon in der Anurenlarve etabliert. Champy (1922), Romeis (1923), Kosmin und Resnitschenko (1927), Bredt (1933), Geigy (1941 *a*, *b*) und Roth (1945) gelangten zur Auffassung, dass

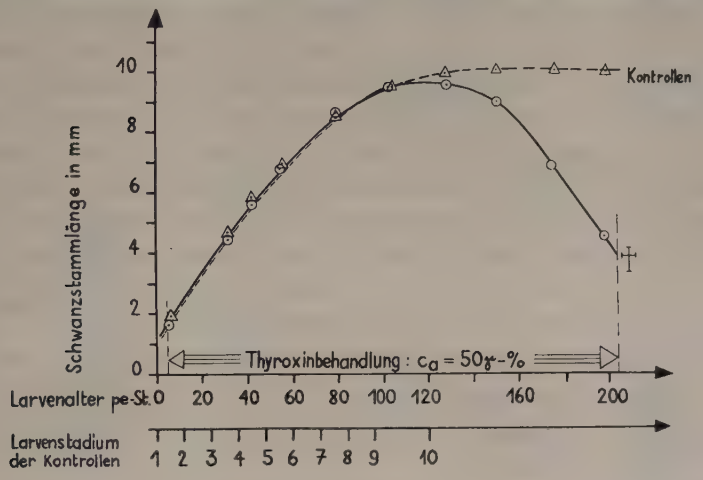


Fig. 24.

Unbeeinflussbarkeit des Längenwachstums der zentralen Schwanzpartie während der Junglarven- und Uebergangsphase durch Thyroxin-Daereinwirkung auf frisch geschlüpfte Junglarven von *Rana temporaria*.

sich der Einfluss des Schilddrüsenhormons erst dann morphologisch erkennbar auswirken kann, wenn sich die Operkeln konstituiert und die Hinterextremitätenanlagen abgerundet haben. Die zitierten Autoren beobachteten übereinstimmend, dass Embryonalentwicklung, Junglarvenentwicklung und -Umwandlung durch Einwirkung von Schilddrüsenstoffen (Jodothyrin, Thyroxin etc.) nicht beeinflusst werden können. Dieser Befund steht in völliger Uebereinstimmung mit den eigenen Versuchsergebnissen. Wie aus Fig. 24 hervorgeht, übt das in stärkerer Konzentration auf die Versuchstiere einwirkende Thyroxin bis zum Erreichen des Jungkaulquappenstadiums nicht den geringsten Einfluss auf das Längenwachstum der zentralen Schwanzpartie aus.

Die morphogenetischen Auswirkungen frühzeitig begonnener Schilddrüsenbehandlung bestehen nicht allein in der Entwicklungsbeschleunigung jener Anlagebezirke, aus denen normalerweise die adulten Organe (Extremitäten, Zunge) hervorgehen, und im Abbau transitorischer Körperteile (Ruderschwanz, Mundbewaffnung etc.), sondern sie umfassen auch Umgestaltungsvorgänge an larvo-adulten Körperterritorien (z. B. Spiraldarm). Die Gesamtheit dieser frühest möglichen Metamorphose-Reaktionen, die sich nach einer auf embryonaler oder frühlarvaler Entwicklungsstufe einsetzenden Schilddrüsenbehandlung im Verlauf der nachfolgenden Entwicklung sukzessive an den auf den Thyroxinreiz ansprechenden Körperterritorien der Anurenlarve abzuzeichnen beginnen, wollen wir als Thyroxin-Frühmetamorphose charakterisieren.

Fig. 25 veranschaulicht das Reaktionsmuster der Thyroxin-Frühmetamorphose, das sich dann ergibt, wenn frisch geschlüpfte Junglarven von *Rana temporaria* (Larven-Stadium Nr. 1) unter dem konstanten Einfluss der Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 1 : 2'000'000$ ($= 50$ γ-%) aufgezüchtet werden. Der Frühmetamorphose-Start der Körperbereiche A, B, C, E, F, G, H und J ist in der Darstellung durch Pfeile markiert und bezieht sich auf die folgenden Reaktionskriterien:

1. Dorsaler und ventraler Flossensaum ($d = 1{,}65$ mm auf der Schwanzlängsaxe) . . . . . $r_R = 0{,}2$
2. Mediane und laterale Partie der Unterlippe . . . . . $r_R = 0{,}2$
3. Schwanzstamm . . . . . $r_R = 0{,}1$
4. Linkes Operkulum . . . . . $q_R = 2{,}0$
5. Hinterextremitätenanlagen . . . . . $w_R = 0{,}3$
6. Oberer Hornkiefer: Thyroxinbedingte Defekte an der medianen Oberkieferbehornung bei allen Individuen deutlich erkennbar.

Anhand der Darstellung erkennen wir, dass sich die ersten Frühmetamorphose-Reaktionen ungefähr gleichzeitig an den papillenförmigen Hinterextremitätenanlagen (A), der medianen Partie der Unterlippe (B) und am oberen Hornkiefer (C) abzuzeichnen beginnen, und zwar gerade ungefähr dann, wenn die Kontrolltiere das Stadium der typischen Jungkaulquappe (Larven-Stadium Nr. 10) erreichen; die kaum richtig zur Ausbildung gelangten Hornschichten und Hornzähnchen des Oberkiefers weisen in diesem Zeitpunkt bereits deutlich erkennbare Defekte auf; nach weiteren 12 Stunden ist ihre vollkommene Abstossung spätestens vollzogen.

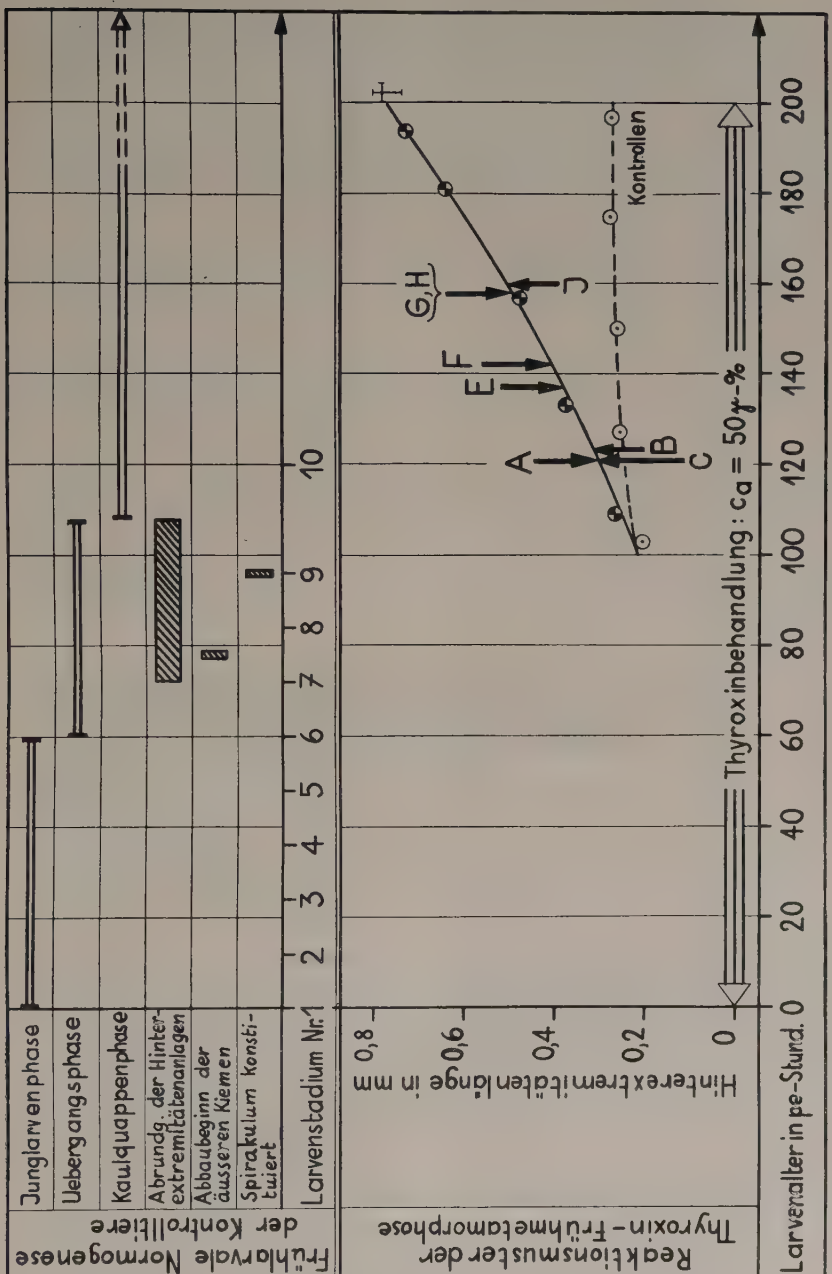


FIG. 25. — Reaktionsmuster der Thyroxin-Frühmetamorphose von *Rana temporaria*.

Kurz nach dem Auftreten dieser ersten Metamorphosesymptome setzt die Reduktion des ventralen (E) und etwas später diejenige des dorsalen Flossensaumes (F) deutlich erkennbar ein. Zuletzt erfolgt die intensive Rückbildung der lateralen Unterlippenpartien (G), die Einschmelzung des linken Operkulums (H) und Bildung des Operkularfensters und praktisch gleichzeitig die intensive Reduktion des Schwanzstammes (J).

Das Reaktionsmuster der Thyroxin-Frühmetamorphose weicht in spezifischer Weise vom Reaktionsmuster jüngerer Kaulquappen ab. Charakteristisch für die Thyroxin-Frühmetamorphose ist die relativ frühzeitig einsetzende Abstossung der Kieferbehornung. Während die Abstossung der Hornschichten und Hornzähnchen in der Thyroxin-Frühmetamorphose gleichzeitig mit der deutlich erkennbar werdenden Entwicklungsbeschleunigung der Hinterextremitätenknospen einsetzt, kommt sie bei jüngeren und mittleren Kaulquappen stets erst einige Zeit nach dem Einsetzen der Hinterextremitäten-Reaktion in Gang, und zwar ungefähr dann, wenn die Reduktion des Flossensaumes sich deutlich abzuzeichnen beginnt.

2. *Vorstellungen über das Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems.*

Die mitgeteilten experimentellen Befunde gestatten uns lediglich eine grobe Abschätzung des Zeitpunktes, in dem sich die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenreiz in der Anurenlarve etabliert. Die Tatsache, dass sich die ersten sichtbaren Auswirkungen einer frühzeitig erfolgenden Schilddrüsenbehandlung vom Jungkaulquappen-Stadium an an den verschiedenen Organen und Organanlagen abzuzeichnen beginnen, zeigt jedenfalls, dass sich in diesem Entwicklungsstadium gewisse Körperterritorien in reaktionsfähigem Zustand befinden. Sie sagt aber, wie nun im Folgenden dargelegt werden soll, nichts darüber aus, wann sich der Bereitschaftszustand in diesen Körperterritorien tatsächlich konstituiert hat. Wir schliessen wohl dann mit Recht auf das Einsetzen des Bereitschaftszustandes, wenn sich nach frühzeitig begonnener und eventuell andauernd fortgesetzter Thyroxinbehandlung im Verlaufe der weiteren Larvenentwicklung die ersten Antworten des Reaktionssystems auf den Thyroxinreiz einstellen. Diese ersten

Auswirkungen frühzeitig begonnener Thyroxinbehandlung sind aber offenbar morphologisch nicht erkennbar, denn wir wissen auf Grund von Erfahrungen an reaktionsbereiten Larven (siehe Abschnitt II), dass die primären Thyroxinwirkungen chemischer und physikalisch-chemischer Natur sind und als solche dem beobachtenden Auge verborgen bleiben. Die sichtbaren Metamorphose-Reaktionen setzen ja bei Thyroxinbehandlung reaktionsbereiter Kaulquappen immer erst nach Ablauf einer bestimmten, relativ langandauernden Latenzzeit (Vorbereitungsphase) ein. Da sich nun nach Thyroxinbehandlung früher Entwicklungsstadien (Embryonen und Junglarven) die sichtbaren Metamorphosesymptome frühestens im Jungkaulquappen-Stadium einstellen, folgern wir, dass das Thyroxin seine primären, unsichtbaren Wirkungen schon vor Erreichen dieses Stadiums auszuüben beginnt. Die Reaktionsbereitschaft gegenüber den Schilddrüsenstoffen etabliert sich also offenbar in einem Entwicklungsstadium, das demjenigen der Jungkaulquappe vorangeht, vielleicht während der Operkelüberwachsung (Witschi, 1942) oder eventuell noch früher.

Während einerseits die obere Grenze des normogenetischen Bereitschaftsbeginns verschiedener Anlagebezirke durch das Stadium der Jungkaulquappe repräsentiert wird, steht andererseits ausser Zweifel, dass dem Metamorphose-Reaktionssystem der Anurenlarve eine untere Altersgrenze seiner Frühbereitschaft gesetzt ist. Allen (1932) vertritt in einer seiner Untersuchungen über die experimentelle Anurenmetamorphose die Auffassung, dass sich der Einfluss des Thyroxins schon im Schwanzknospenstadium geltend machen kann, sagt er doch selbst bei der Zusammenfassung seiner Versuchsergebnisse: „The influence of thyroxin is proportional to the age of the tadpole, being slight in the young periods beginning with tail bud stage and becoming far more pronounced in the period of 20 mm total length". Verschiedene experimentelle Befunde sprechen hingegen dafür, dass die zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke des Anurenembryos noch nicht auf den Schilddrüsenreiz anzusprechen vermögen. Bei den Versuchen, in denen verschiedene Embryonal- und Junglarvenstadien von *Rana temporaria* einer kurzfristigen Schilddrüsenbehandlung unterzogen wurden, fiel ja Romeis (1923) auf, „dass der Zeitpunkt, zu dem die Folgeerscheinungen der Jodothyrinbehand-

lung erkennbar werden, bei allen, ob nun die Behandlung frühzeitig oder spät erfolgte, ziemlich übereinstimmt" und zwar nach Schwinden der äusseren Kiemen. Romeis schliesst aus diesem Befund, dass die in den Embryo eindringenden Schilddrüsenstoffe noch keinen spezifischen Einfluss auf diese frühen Entwicklungsstadien auszuüben vermögen, dass sie aber im sich weiterentwickelnden Organismus in latenter Form vorhanden bleiben und erst dann morphogenetische Wirkungen zu entfalten beginnen, wenn die Larven in ein Alter gelangen, in dem sie für den Schilddrüsenreiz empfindlich werden.

Vom Wunsche geleitet, die Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems abzuklären und ein zeitliches Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft zu entwerfen, wurde eine quantitative Methode zur Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns entwickelt und ausgearbeitet. Da die den Bereitschaftsbeginn anzeigenden Primärwirkungen des Thyroxins sich äusserlich nicht manifestieren, kann uns nur eine indirekte Bestimmungsmethode Erfolg versprechen. Lassen wir unter konstant bleibenden Versuchsbedingungen stets dieselbe Thyroxindosis auf verschieden alte Embryonen, Junglarven und Jungkaulquappen einwirken, so beginnen sich die verschiedenen Metamorphose-Reaktionen erst von jeweils ganz bestimmten Zeitpunkten an an den auf den Thyroxinreiz ansprechenden Körperterritorien der Versuchstiere abzuzeichnen. Bestimmen wir für jeden (einem jeweils bestimmten Behandlungsbeginn entsprechenden) Versuchsansatz die Latenzzeit (L), die zwischen dem Einwirkungsbeginn (A_e) und dem regionalen Metamorphose-Start verstreicht, und tragen wir diese in einem Koordinatensystem in Abhängigkeit vom Behandlungsbeginn auf, so erhalten wir den empirischen Verlauf der Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit [$L = f(A_e)$]. In den nachfolgenden Abhandlungen soll gezeigt werden, dass uns diese Abhängigkeit — die wir inskünftig kurz als die A_e, L-Beziehung bezeichnen wollen — eine quantitative Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns bei Anurenlarven ermöglicht.

3. *Der regionale Ablauf des Metamorphose-Induktionsvorganges bei Thyroxineinwirkung auf noch nicht reaktionsbereite Entwicklungsstadien von Anurenkeimen und -larven.*

Die Ableitung der A_e, L-Beziehung erfordert eine eingehende Betrachtung des Induktionsvorganges in Anurenkeimen oder -larven, denen schon vor dem Zustandekommen des Bereitschaftszustandes eine Thyroxinbehandlung zuteil geworden ist.

Bevor wir uns der Analyse des Induktionsvorganges zuwenden, müssen wir abklären, ob das Thyroxin vom Embryo oder von der Junglarve überhaupt aufgenommen wird. Romeis (1923) behandelte Embryonen von *Rana temporaria* während 24 Stunden mit Jodothyrin und Merck'schen Thyreoidea-Tabletten (entfettete Schilddrüsensubstanz). Die einmalige Einwirkung von Jodothyrin (0,4 gr/400 ccm Wasser), die vom Gastrula- bis zum Neurulastadium währte, verursachte im Verlaufe der weiteren Entwicklung das Auftreten der für die Schilddrüsenfütterung charakteristischen Symptome, während die gleichzeitige Behandlung der Embryonen mit einer Aufschwemmung von Merck'schen Thyreoidea-Tabletten in der verwendeten Konzentration zu keinen wesentlichen Folgeerscheinungen führte. Romeis schliesst daraus, dass die Embryonen nicht imstande sind, hochkolloidale Eiweisslösungen aufzunehmen, während dialysierende Substanzen wie das Jodothyrin oder das Thyroxin ihre als semipermeable Membran wirkende Körperoberfläche leicht durchdringen können.

Dass die Junglarven imstande sind, Thyroxin aus ihrer Badeflüssigkeit aufzunehmen, konnte neuerdings von Geigy[1] mit Hilfe einer anderen Methodik bestätigt werden. Dieser Autor hielt Junglarven in Thyroxinlösungen und verfütterte sie anschliessend an mittlere Kaulquappen. Durch die Verfütterung der mit Thyroxin „aufgeladenen" Junglarven wurden die Kaulquappen in der Folge zu rascher Metamorphose veranlasst.

Wir betrachten zunächst einen ersten Spezialfall der Thyroxinbehandlung früher Entwicklungsstadien, der sich unter folgenden Voraussetzungen ergibt: 1. Die Thyroxineinwirkung erfolge in der Form eines Dauerbades bei periodischer Erneuerung der Badeflüssigkeit; 2. die applizierte Thyroxinkonzentration weise einen

[1] Nach mündlicher Mitteilung

konstant bleibenden und überschwelligen Betrag auf. Diesem ersten Spezialfall kann ein theoretisches Schema [1] zugrundegelegt werden, das in Fig. 26 zur Darstellung gelangt. Auf der Abszissenachse ist das Alter (A) aufgetragen, auf der Ordinatenaxe I die Thyroxinkonzentration (c), auf der Ordinatenachse II die lineare Abmessung (X) eines zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten transitorischen Organs. Die Reaktionsbereitschaft dieses Organs etabliere sich in den Versuchs- und Kontrolltieren im Alter A_b

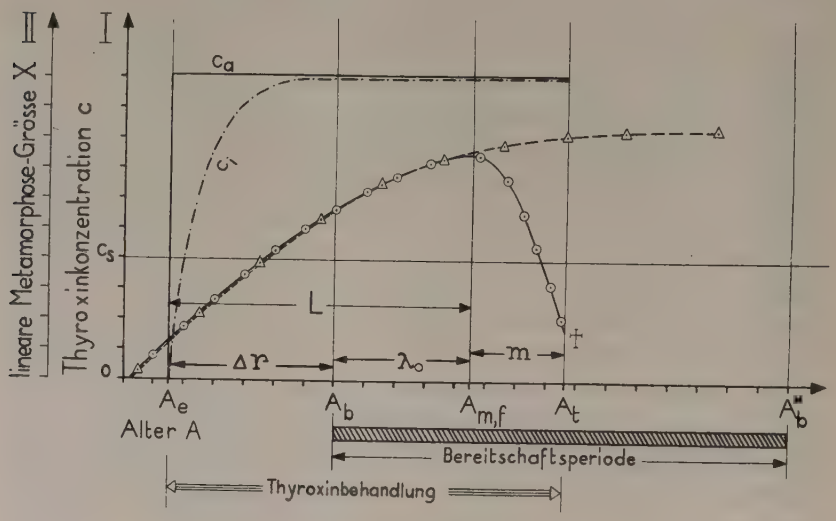


Fig. 26.

Theoretisches Schema der Auslösung der Frühmetamorphose-Reaktionen durch Thyroxin-Dauereinwirkung auf Anurenkeime und -Junglarven (Spezialfall I). Behandelte Individuen = ⊙, Kontrollen = △, L = regionale Latenzzeit, übrige Legende im Text.

(normogenetischer Bereitschaftsbeginn) und bleibe bei den Kontrolltieren bis in das Alter A_b^* (normogenetisches Bereitschaftsende) erhalten.

Die Thyroxinbehandlung setzt lange vor dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft im Zeitpunkt A_e (Einwirkungs- oder Behandlungsbeginn) ein und dauert entsprechend Voraussetzung (1) bis zum Versuchsende im Alter A_t. Das Thyroxin beginnt sofort nach Behandlungsbeginn in den Körper des Embryos oder der

[1] Vergl. J. Needham, Biochemistry and morphogenesis, Cambridge, 1942, Abschnitt 2.15, Teil II, S. 117-118.

Junglarve einzudringen und schon nach kurzer Zeit in metamorphosewirksamer Dosis auf die Gewebe einzuwirken. Infolge der Thyroxinaufnahme durch die Larven wird sich die Thyroxin-Aussenkonzentration (c_a) etwas erniedrigen. Da die Dauerbehandlung unter periodischer Erneuerung der Badeflüssigkeit erfolgt, wird der durch die Aufnahme verursachte Thyroxinverlust der Aussenlösung kompensiert, sodass die Larven während der gesamten Versuchsdauer unter der Wirkung einer praktisch konstant bleibenden Thyroxin-Aussenkonzentration stehen, deren Betrag gleich demjenigen der verabreichten Konzentration ist. Die Thyroxin-Innenkonzentration (c_i) wird infolge der Voraussetzungen (1) und (2) mit zunehmender Behandlungszeit stetig ansteigen und im Falle passiver Penetration des Thyroxins nach theoretisch unendlich langer, praktisch aber schon nach relativ kurzer Versuchszeit den Betrag der Thyroxin-Aussenkonzentration annehmen (Permeationsgleichgewicht).

Obschon das Thyroxin in den Körper des Embryos und der Junglarve eindringen kann und offenbar bereits kurze Zeit nach Behandlungsbeginn in überschwelliger Konzentration auf deren Gewebe einzuwirken beginnt, vermag es auf die zur Reaktionsbereitschaft heranreifenden Anlagebezirke noch keinen Einfluss auszuüben. Das Längenwachstum des transitorischen Organs erfolgt daher bis zum Erreichen eines bestimmten Alters synchron bei Versuchs- und Kontrolltieren. Der Einfluss der Thyroxinbehandlung beginnt sich erst im Alter A_b, in dem sich die Reaktionsbereitschaft eben etabliert hat, am transitorischen Organ auszuwirken. Da sowohl Thyroxin-Aussen- als auch Thyroxin-Innenkonzentration infolge der periodischen Erneuerung der Badeflüssigkeit beim Einsetzen des Bereitschaftszustandes überschwellige Beträge aufweisen und während der nachfolgenden Versuchszeit beibehalten, erfolgen die unter dem direkten Einfluss des Thyroxins im transitorischen Organ bei Bereitschaftsbeginn in Gang gesetzten chemischen und physikalisch-chemischen Prozesse mit jener Intensität, die das Zustandekommen einer sichtbaren Induktionswirkung am Erfolgsorgan gewährleistet. Die zunächst unsichtbaren Auswirkungen des Thyroxins erzwingen in den Geweben des transitorischen Organs eine Verschiebung des Stoffwechselschwerpunktes von der Assimilation zur Dissimilation. Entsprechend dem Verhalten, das wir bei älteren, in reaktionsfähigem Zustande zur

Thyroxinbehandlung gelangenden Entwicklungsstadien beobachtet haben (siehe Abschnitt II), erfolgt diese Verlagerung des Stoffwechselschwerpunktes offenbar nur sehr langsam. Versuchs- und Kontrolltiere zeigen daher noch während einiger Zeit nach Erlangung der Reaktionsbereitschaft resp. nach Einsetzen der Frühreaktion synchrones Längenwachstum. Allmählich aber beginnt sich die Frühreaktion in einer Wachstumshemmung sichtbar abzuzeichnen, die schliesslich zu Wachstumsstillstand führt, um im Alter $A_{m,f}$ (regionaler Frühmetamorphose-Start) in die intensive Rückbildung des transitorischen Organs überzugehen.

Setzt die Thyroxinbehandlung vor dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft ein und erfolgt sie in der Form eines periodisch erneuerten Dauerbades von überschwelliger Thyroxinkonzentration, so lässt der regionale Ablauf des Metamorphose-Induktionsvorganges stets drei charakteristische Phasen (siehe Fig. 26) voneinander unterscheiden:

1. Die Reifungsphase ($\triangle r$), die gleich der Behandlungsphase ist, in der die zur Thyroxinempfindlichkeit determinierte Körperpartie zur Reaktionsbereitschaft heranreift. Die Reifungsphase ist somit gleich der Dauer zwischen dem Behandlungsbeginn (A_e) und dem Bereitschaftsbeginn (A_b).
2. Die „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn“ (λ_o) ist gleich der Behandlungsphase zwischen dem Primärerfolg des Thyroxinreizes bei Bereitschaftsbeginn (A_b) und dem regionalen Frühmetamorphose-Start ($A_{m,f}$).
3. Die Phase der Frühmetamorphose-Reaktion (m) ist gleich der Behandlungsphase zwischen dem regionalen Frühmetamorphose-Start ($A_{m,f}$) und dem katastrophalen Abbruch des Reaktionsablaufes durch das vorzeitige Eingehen der Versuchstiere (A_t).

Wir betrachten ferner einen zweiten Spezialfall der Thyroxinbehandlung noch nicht reaktionsfähiger Entwicklungsstadien, der sich unter den folgenden Voraussetzungen ergibt: 1. Die Thyroxineinwirkung erfolge in der Form eines kurzfristigen Bades, das periodisch erneuert und noch vor dem Zustandekommen der Reaktions-

bereitschaft aufgehoben werde. 2. Die applizierte Thyroxinkonzentration weise einen konstant bleibenden und überschwelligen Betrag auf. 3. Nach Beendigung der Thyroxinbehandlung werde die Versuchslösung fortlaufend in regelmässigen Zeitabständen durch eine reine, thyroxinfreie Versuchslösung ersetzt. In den Fig. 27/28 gelangt dieser Spezialfall in schematisierter Form zur Darstellung. Es gelten dabei dieselben Bezeichnungen wie die in Fig. 26 verwendeten. Die Thyroxineinwirkung beginnt im Zeitpunkt A_e und

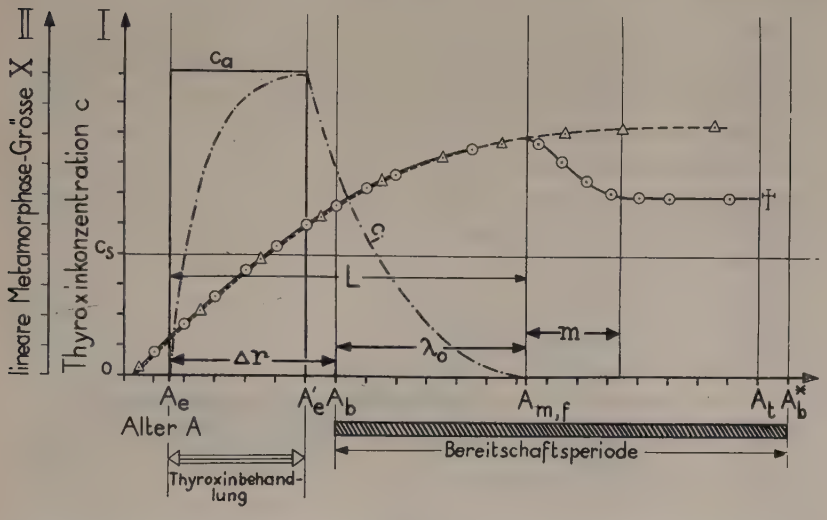


Fig. 27.

Theoretisches Schema der Auslösung der Frühmetamorphose-Reaktionen durch kurzfristige Thyroxinbehandlung von Anurenkeimen und -Junglarven (Spezialfall II *a*). Legende do. Fig. 26.

wird im Alter A'_e, d. h. entsprechend Voraussetzung (1) einige Zeit vor Bereitschaftsbeginn sistiert. Da während der Behandlungsphase eine periodische Erneuerung der Badeflüssigkeit erfolgt, bleibt die auf die Larven einwirkende Thyroxinkonzentration während dieser Zeit eine praktisch konstante und überschwellige. Im Zeitpunkt A'_e wird die thyroxinhaltige Badeflüssigkeit durch eine thyroxinfreie Versuchslösung ersetzt. Dadurch entsteht plötzlich ein ausgesprochener Konzentrationsunterschied zwischen Thyroxin-Aussen- und Thyroxin-Innenlösung. Dieser bewirkt, dass ein Teil des während der Behandlungsphase von den Versuchstieren aufgenommenen Thyroxins aus diesen in die Badeflüssigkeit abdiffundiert.

Die Folge davon ist eine stetige Abnahme der Thyroxin-Innenkonzentration c_i vom Zeitpunkt A'_e an. Die Geschwindigkeit, mit der der Thyroxingehalt in den Geweben abnimmt, kann durch einen unter Umständen stattfindenden Verbrauch des Thyroxins im Stoffwechsel der Larven noch gefördert werden. Da die Aussenlösung vom Abbruch der Behandlung an fortlaufend durch eine thyroxinfreie Versuchslösung ersetzt wird, weist die Thyroxin-Aussenkonzentration c_a von A'_e an praktisch den Betrag Null auf.

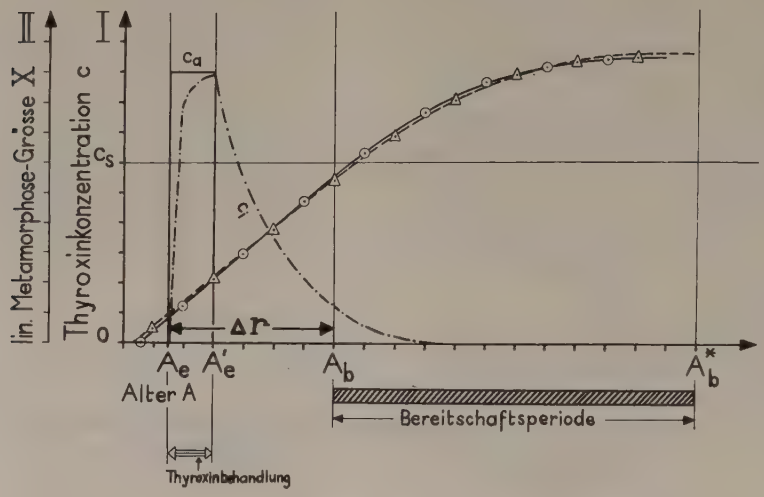


Fig. 28.

Theoretisches Schema der Auslösung der Frühmetamorphose-Reaktionen durch kurzfristige Thyroxinbehandlung von Anurenkeimen und -Junglarven (Spezialfall II *b*). Legende do. Fig. 26.

Je nach den speziellen Versuchsbedingungen kann nun einerseits der in Fig. 27 zur Darstellung gelangende Fall eintreten, dass die Thyroxin-Innenkonzentration noch während kürzerer Zeit nach dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft einen überschwelligen Betrag aufweist. Die unter dem direkten Einfluss des im Körperinnern angereicherten Thyroxins bei Bereitschaftsbeginn in Gang kommenden vorbereitenden Umwandlungen verlieren aber infolge der kontinuierlichen Verminderung der Thyroxin-Innenkonzentration mit zunehmender Versuchszeit merklich an Intensität. In der Folge setzt die Frühreaktion wohl ein, bricht aber, da die Thyroxin-Innenkonzentration inzwischen auf Null abge-

sunken ist und eine neuerliche Thyroxinzufuhr von aussen her ausbleibt, bereits nach einiger Zeit ab und das transitorische Organ bleibt in der Folge bis zum Eingehen der Versuchstiere im Zustande teilweiser Rückbildung stehen (Auftreten einer regionalen Teilmetamorphose). Bei geeigneter Wahl des Behandlungsbeginns, der applizierten Thyroxinkonzentration und der Behandlungsdauer kann andererseits der in Fig. 28 zur Darstellung gelangende Fall eintreten, dass die Thyroxin-Innenkonzentration beim Einsetzen des Bereitschaftszustandes nur noch einen unterschwelligen Betrag aufweist. Da aber unterschwellige Thyroxin-Innenkonzentrationen nicht imstande sind, sichtbare Induktionswirkungen am Erfolgsorgan zu erzeugen, setzt die Rückbildung des transitorischen Organs nicht ein und dasselbe entwickelt sich in der Folge synchron mit demjenigen der Kontrolltiere. Dieser Extremfall wird bei der Applikation derselben Thyroxindosis umso eher eintreten, je früher die Einwirkung erfolgt, d. h. je jüngere Entwicklungsstadien unter den kurzfristigen Einfluss einer bestimmten Thyroxin-Aussenkonzentration gelangen. Er wird bei konstanter Thyroxindosis und konstantem Behandlungsbeginn ferner in erster Linie für die thyroxin-unempfindlicheren Körperbereiche (Schwanzstamm, Operkulum, Hornkiefer, innerer Kiemenapparat) zu erwarten sein.

Diese theoretischen Ueberlegungen können im Experiment überprüft werden. Unterwerfen wir frisch geschlüpfte Junglarven von *Rana temporaria*, von denen anzunehmen ist, dass sie sich noch nicht in reaktionsfähigem Zustand befinden, einer Dauerbehandlung durch die Thyroxin-Aussenkonzentration 1 : 5'000'000 (=20 γ-%), so beginnen sich vom Jungkaulquappen-Stadium an an Mundbewaffnung, linkem Operkulum, Ruderschwanz, Darm und Extremitätenanlagen deutliche Metamorphosesymptome abzuzeichnen. Wird die Behandlung hingegen schon im Stadium der Junglarve mit maximal entwickelten äusseren Kiemen abgebrochen, so wirkt sich der Einfluss der Thyroxinbehandlung lediglich in einer geringfügigen Entwicklungsbeschleunigung der Hinterextremitätenanlagen aus. Mundbewaffnung, Schwanzstamm, Flossensaum, Spiraldarm etc. bleiben von der Thyroxinbehandlung äusserlich vollkommen unberührt und ihr Wachstum erfolgt synchron mit demjenigen der Kontrollen. Es entwickeln sich in der Folge aus den Versuchstieren normal-strukturierte Kaulquappen,

die nach mehreren Wochen synchron mit den Kontrollen eine normale Metamorphose durchlaufen. Andererseits lassen sich — wie aus den Versuchen von Romeis (1923) hervorgeht — bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen schon durch einmalige, 24 Stunden dauernde massive Einwirkung von Jodothyrin (Jodothyrinkonzentration $c_a = 1:1000$) auf Embryonalstadien von *Rana temporaria* deutliche Metamorphosesymptome im Verlauf der nachfolgenden Larvenentwicklung an den thyroxinempfindlicheren Körperbereichen erzeugen; und zwar treten sie in Uebereinstimmung mit unseren theoretischen Folgerungen umso ausgesprochener in Erscheinung, je älter die zur kurzfristigen Schilddrüsenbehandlung gelangenden Embryonen und Junglarven sind.

Zusammenfassend ergibt sich: Erfolgt die Thyroxinbehandlung noch nicht reaktionsbereiter Embryonal- und Larvenstadien durch eine dauernd einwirkende und überschwellige Thyroxin-Aussenkonzentration, so sind nach dem Erreichen des Jungkaulquappen-Stadiums makroskopisch erkennbare Reaktionen an allen auf den Thyroxinreiz ansprechenden Körperbereichen zu erwarten. Erfolgt hingegen die Behandlung vor Bereitschaftsbeginn in der Form eines kurzfristigen Thyroxinbades von überschwelliger Thyroxinkonzentration, so hängt es in starkem Masse vom Einwirkungsbeginn, von der Behandlungsdauer und vom Betrag der applizierten Thyroxinkonzentration ab, ob sich im Verlauf der nachfolgenden Larvenentwicklung an sämtlichen Erfolgsorganen des Schilddrüsenhormons sichtbare Auswirkungen der Thyroxinbehandlung einstellen oder nicht.

4. *Die hypothetische Abhängigkeit zwischen Einwirkungbeginn und Latenzzeit.*

Die A_e, L-Abhängigkeit nimmt dann eine besonders übersichtliche und der mathematischen Analyse leicht zugängliche Form an, wenn die Versuchstiere bei definierten Aufzuchtbedingungen unter

dem dauernden Einfluss einer bestimmten Thyroxin-Aussenkonzentration zu Metamorphose-Reaktionen veranlasst werden.

Setzt die Thyroxinbehandlung junger Anurenlarven vor dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft ein und erfolgt sie in der Form eines Dauerbades von überschwelliger Thyroxin-Aussenkonzentration, so unterteilt sich der Induktionsvorgang stets in Reifungs-, Vorbereitungs- und Metamorphose-Reaktionsphase. Erfolgt hingegen die Thyroxineinwirkung auf reaktionsbereite Larvenstadien, so verschwindet die Reifungsphase und der Induktionsvorgang reduziert sich auf Vorbereitungs- und Metamorphose-Reaktionsphase.

Infolge dieses Unterschiedes im Ablauf des Induktionsvorganges bei reaktionsbereiten und noch nicht reaktionsbereiten Behandlungsstadien ist zu erwarten, dass die A_e, L-Abhängigkeit in den beiden Altersabschnitten vor und nach dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn verschiedene Gestalt annimmt. Bei der Ableitung dieser Abhängigkeit werden wir daher die beiden Altersintervalle gesondert behandeln.

Für die nun zur Darstellung gelangende Ableitung der A_e, L-Beziehung seien folgende Voraussetzungen erfüllt: 1. Die Versuchs- und Kontrolltiere seien genetisch einheitlich, d. h. sollen ein- und derselben Population angehören (einheitliche Reaktionsnorm des Ausgangsmaterials). 2. Die der Thyroxinbehandlung unterworfenen Individuen sollen unter der dauernden Wirkung einer konstant gehaltenen Thyroxin-Aussenkonzentration c_a stehen. 3. Der Betrag der Thyroxin-Aussenkonzentration sei in Bezug auf die zur Untersuchung gelangenden reagierenden Körperteile ein überschwelliger. 4. Die Aufzucht der Behandlungsstadien (normogenetisches Aufzuchtmaterial) erfolge bei derselben Temperatur und Individuen-Raumdichte wie die Aufzucht der unter dem Einfluss des Thyroxins stehenden Versuchstiere. 5. Die äussere Ernährung des normogenetischen Aufzuchtmaterials sei eine standardisierte und erfolge erst zu Beginn des Jungkaulquappen-Stadiums, d. h. in einem Zeitpunkt, in dem sich die autochthonen Dotterreserven nahezu erschöpft haben.

Wir wollen der Deduktion ferner folgende vereinfachenden Annahmen zugrundelegen. 1. Der Einfluss der autochthonen Schilddrüsenaktivität auf den Ablauf und das Ausmass der durch die Thyroxinbehandlung erzwungenen Reaktionen sei so gering, dass er vernachlässigt werden darf. 2. Die frühzeitige Anwesenheit überschwelliger Thyroxindosen im noch nicht reaktionsbereiten Organismus beeinflusse den Vorgang der Bereitschaftsetablierung nicht. 3. Die Dauer der „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn“ sei unabhängig von der Dauer der

„Vorbehandlung", welche die noch nicht reaktionsbereiten Larven während der Reifungsphase durch die Thyroxin-Ausenkonzentration c_a erfahren. 4. Der Ernährungszustand bei Bereitschaftsbeginn sei für alle in den Versuch eingehenden Larven innerhalb der biologischen Variabilität derselbe. 5. Der im Jungkaulquappen-Stadium stattfindende Uebergang von der reinen Dotterernährung zur aktiven Nahrungsaufnahme beeinflusse die Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials nicht oder nur unwesentlich.

Hypothetischer Verlauf der A_e, L-Abhängigkeit im Altersintervall I ($A_e = 0$ bis $A_e = A_b$): Die Thyroxineinwirkung erfolge vor dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn ($0 \leqslant A_e < A_b$). Die regionale Latenzzeit L, die zwischen dem Behandlungsbeginn A_e und dem Einsetzen der Frühmetamorphose-Reaktion im Zeitpunkt $A_{m,f}$ verstreicht ($L = A_{m,f} - A_e$), setzt sich in diesem Fall stets aus Reifungsphase Δr und „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn" λ_o zusammen (siehe Fig. 26):

$$L = \Delta r + \lambda_o \,. \tag{1}$$

In den Versuchstieren, die seit dem Zeitpunkt A_e unter dem dauernden Einfluss einer überschwelligen Thyroxin-Aussenkonzentration c_a stehen, setze der Bereitschaftszustand im Alter A_b ein. Für die Reifungsphase gilt dann nach Fig. 26 der Ausdruck

$$\Delta r = A_b - A_e \,. \tag{2}$$

Ersetzen wir Δr in Gl. (1) durch Gl. (2), so folgt für die Latenzzeit im Altersintervall I die Beziehung

$$L = A_b - A_e + \lambda_o \,. \tag{3}$$

Unter definierten Aufzuchtbedingungen setzt die Reaktionsbereitschaft in den unbehandelten Larven in jenem Zeitpunkt ein, den wir als normogenetischen Bereitschaftsbeginn bezeichnet haben. Dieser stellt für ein genetisch einheitliches Ausgangsmaterial eine Artkonstante dar. Da wir nun annehmen, dass die frühzeitige Anwesenheit überschwelliger Thyroxinkonzentrationen in der noch nicht reaktionsbereiten Larve den Vorgang der Bereitschaftsetablierung nicht beeinflusse [Annahme (2)], so ist das Alter, in dem die Reaktionsbereitschaft in den seit den Zeitpunkten A_e unter dem Einfluss des Thyroxins stehenden Versuchstieren zustandekommt, unabhängig sowohl vom Betrag der einwirkenden Thyroxin-Aussenkonzentration c_a als auch vom Behandlungsbeginn A_e. Weil ferner die Aufzucht der Behandlungsstadien unter denselben Bedingungen (Temperatur, Individuen-Raumdichte etc.) erfolgt wie diejenige der unter der Einwirkung des Thyroxins stehenden Versuchstiere [Voraussetzung (4)], muss in Gl. (3)

$$A_b = \text{constans} \tag{4}$$

gesetzt werden.

Werden reaktionsbereite Anurenlarven unter konstanten Aufzuchtbedingungen dem dauernden Einfluss des Thyroxins exponiert, so

ändert sich die Dauer der Vorbereitungsphase λ entsprechend der Beziehung (siehe S. 53)

$$\lambda = \lambda_{min} \cdot \left(1 + \frac{K}{c_a}\right) \qquad (5)$$

(λ_{min} = Minimalwert der Vorbereitungsphase, K = Konstante) mit ansteigender Thyroxin-Aussenkonzentration c_a. Die im Altersintervall I unter den permanenten Einfluss der Thyroxin-Aussenkonzentration c_a gelangenden Versuchstiere erfahren während der Reifungsphase Δr eine Thyroxinbehandlung, die sich erst beim Zustandekommen des Bereitschaftszustandes auszuwirken beginnt und deren Dauer vom Einwirkungsbeginn abhängt. Da wir annehmen, dass die Dauer dieser „Thyroxin-Vorbehandlung" keinen resp. nur einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der bei Bereitschaftsbeginn in Gang kommenden vorbereitenden Umwandlungen ausübe [Annahme (3)], so wird der Betrag von λ_o bei konstanten Aufzuchtbedingungen allein von der verwendeten Thyroxin-Aussenkonzentration c_a gemäss Gl. (5) abhängen. Weil aber c_a für alle Versuchsansätze dieselbe ist und während der gesamten Versuchsdauer konstant gehalten wird [Voraussetzung (2)], sowie infolge der Voraussetzungen (1), (3), (4) und der Annahmen (1) und (4), ist der Betrag der „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn" für die Individuen aller Versuchsansätze derselbe. Es muss also in Gl. (3)

$$\lambda_o = \text{constans} \qquad (6)$$

gesetzt werden.

Mit Gl. (3), (4) und (6) ergibt sich somit für die A_e, L-Abhängigkeit im Altersintervall I [$L = f_I(A_e)$] die hypothetische Beziehung

$$L = -A_e + C \qquad (7)$$

worin C eine Konstante vom Betrag $C = A_b + \lambda_o$ bedeutet.

Wenn Behandlungsbeginn und Latenzzeit in denselben Zeitmassen aufgetragen werden, stellt Gl. (7) die Gleichung einer Geraden dar, deren Neigungswinkel $\alpha = 135°$ ($tg\,\alpha = -1$) beträgt und die die Ordinatenachse im Abstande C schneidet. Es ist also zu erwarten, dass die Latenzzeit im Altersintervall I mit zunehmendem Behandlungsbeginn linear abnimmt.

Erfolgt die Thyroxinbehandlung bei Bereitschaftsbeginn ($A_e = A_b$), so errechnet sich die Latenzzeit aus Gl. (7) zu

$$L(A_b) = \lambda_o ,$$

d. h. die Latenzzeit reduziert sich bei Bereitschaftsbeginn infolge des Verschwindens der Reifungsphase zum richtigen Betrag, zur „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn".

Hypothetischer Verlauf der A_e, L-Abhängigkeit im Altersintervall II ($A_e = A_b$ bis $A_e = A_b^*$): Die Thyroxineinwirkung setze innerhalb der normogenetischen Bereitschaftsperiode ein ($A_b \leqslant A_e \leqslant A_b^*$). In diesem Fall bieten die Gewebe dem Thyroxin jeweils schon bei Behandlungsbeginn eine Angriffsfläche dar, sodass die vorbereitenden Umwandlungen der Metamorphose-Reaktionen

sofort einsetzen können. Da die Reifungsphase in diesem Fall stets gleich Null ist, wird die regionale Latenzzeit im Altersintervall II mit der Vorbereitungsphase identisch (siehe Abschnitt II, S. 46):

$$L = \lambda . \tag{8}$$

Es muss angenommen werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der auf einen definierten Thyroxinreiz [Voraussetzung (2)] ansprechenden Körperteile bei konstanten Aufzuchtbedingungen [Voraussetzung (4)] allein vom Alter der Versuchstiere abhängt:

$$L = \lambda = f_{II}(A_e) . \tag{9}$$

Diese Funktion muss so beschaffen sein, dass sie für $A_e = A_b$ (Beginn der Thyroxinbehandlung bei Bereitschaftsbeginn) den definitionsgemässen Betrag $L(A_b) = \lambda_0$ liefert.

Wir haben der Deduktion der A_e, L-Abhängigkeit u. a. die Annahme zugrundegelegt, dass die autochthonen Schilddrüsenstoffe in den Versuchstieren in so geringer Menge angereichert sind, dass ihr Einfluss auf den Ablauf der durch die Thyroxinbehandlung induzierten Reaktionen vernachlässigt werden darf [Annahme (1)]. Infolgedessen wird der spezifische Verlauf der A_e, L-Abhängigkeit in dem sich über die normogenetische Bereitschaftsperiode erstreckenden Altersintervall II allein durch die Art und Weise bestimmt, in der sich die Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials mit zunehmendem Larvenalter ändert.

Es erhebt sich nun die Frage, ob innerhalb der Bereitschaftsperiode mit fortschreitendem Einwirkungsbeginn eine langsame oder rasche Aenderung der Latenzzeit zu erwarten ist. Erfährungsmässig zeigt sich, dass während der ausgedehnten, bis zur Prometamorphose dauernden Kaulquappenphase sowohl Wachstum als auch Differenzierung ausgesprochen langsam und gleichmässig erfolgen. Entsprechend langsam scheint sich nun auch die Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials innerhalb der sich über die Kaulquappenphase erstreckenden Bereitschaftsperiode mit zunehmendem Larvenalter zu ändern. So erfolgt beispielsweise die Abstossung der Kieferbehornung sowohl bei Jungkaulquappen, als auch bei mittleren und älteren, unmittelbar vor der Prometamorphose stehenden Kaulquappen nach einer Latenzzeit von 3—4 Tagen, wenn die Ausgangsstadien bei einer Temperatur von 22° C unter den dauernden Einfluss der Thyroxin-Aussenkonzentration $c_a = 10$ γ-% gelangen und ihre auchtochthone Schilddrüsenaktivität durch Dauerbehandlung mit Tetramethylthioharnstoff in hinreichendem Masse gehemmt wird. Es darf somit angenommen werden, dass sich die Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials innerhalb der Bereitschaftsperiode, wenn überhaupt, nur sehr langsam mit zunehmendem Alter und Entwicklungszustand der Larven ändert. Dementsprechend wird die Dauer der Vorbereitungsphase resp. die mit ihr im Altersintervall II identische Latenzzeit nur sehr langsam erfolgenden Variationen unterworfen sein. Für die lineare Annäherung des allgemeinen Ausdrucks für die Latenz-

zeit im Altersintervall II [Gl. (9)] sind daher kleine Steigungswinkel, d. h. etwa durch

$$-20° \leqslant \alpha \leqslant +20°$$

eingeschränkte Winkel zu erwarten. Es folgt somit für den im allgemeinen Fall zu erwartenden Verlauf der A_e, L-Beziehung im Altersintervall II eine schwach gekrümmte Kurve.

Ein erster Spezialfall (A) ergibt sich, wenn wir annehmen, dass die

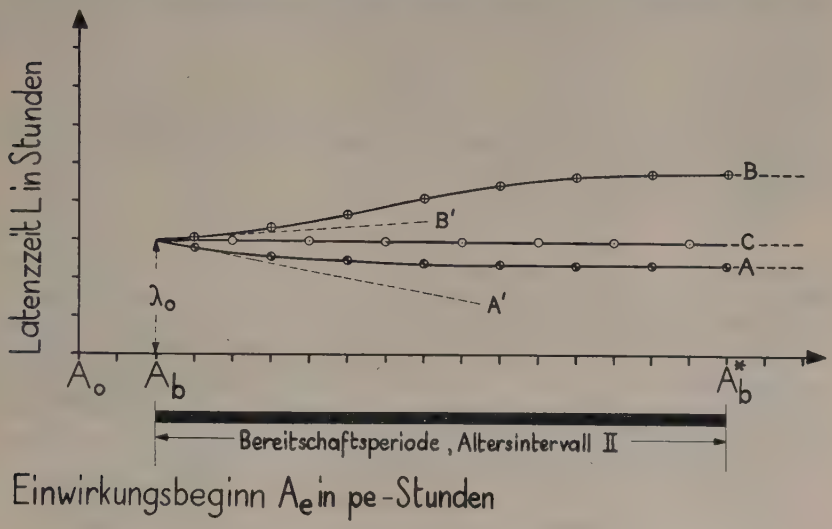


Fig. 29.

Hypothetischer Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit im Altersintervall II (Spezialfälle A, B und C).

Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials mit zunehmendem Larvenalter eine Steigerung erfahre [1]. In diesem Fall wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Thyroxin-Aussenkonzentration mit steigendem Behandlungsbeginn A_e offenbar kontinuierlich zunehmen; entsprechend wird dann die zur Reaktionsgeschwindigkeit umgekehrt proportionale Latenzzeit innerhalb der Bereitschaftsperiode mit fortschreitendem Einwirkungsbeginn stetig abnehmen (siehe Fig. 29 unter „A"). Ein zweiter Spezialfall (B) lässt sich gewinnen, wenn wir annehmen, dass das reagierende Material mit steigendem Alter gegenüber dem Thyroxinreiz unempfindlicher werde. In diesem Fall wird die Dauer der Vorbereitungsphase resp. die Latenzzeit bei einer konstant bleibenden Thyroxin-Aussenkonzentration mit steigendem Behandlungsbeginn offenbar stetig zunehmen (siehe Fig. 29 unter „B"). Ein dritter Spezialfall

[1] Vergl. Romeis (1923) und Kosmin und Resnitschenko (1927), sowie andere Autoren.

(C) endlich ergibt sich, wenn wir annehmen, dass die Thyroxinempfindlichkeit des reagierenden Materials mit zunehmendem Alter und Reifezustand überhaupt keine Aenderungen erfahre. In diesem letzten Spezialfall wird die Dauer der Vorbereitungsphase unabhängig vom Einwirkungsbeginn sein und es reduziert sich der allgemeine Ausdruck für die Latenzzeit [Gl. (9)] im Altersintervall II zu $L = \lambda_0 = \text{constans}$. Im Grenzfall nimmt also die Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit in dem sich über die normogenetische Bereitschaftsperiode erstreckenden Altersintervall II die Gestalt einer im Abstande λ_0 parallel zur Abszissenachse verlaufenden Geraden an (siehe Fig. 29 unter „C").

Betrachten wir einen im Verhältnis zur gesamten Bereitschaftsperiode kleinen Abschnitt des Altersintervalls II, so dürfen wir den allgemeinen Ansatz für die Latenzzeit [Gl. (9)] durch seine lineare Annäherung (siehe Fig. 29 unter A′ und B′)

$$L = m\,(A_e - A_b) + \lambda_0 \qquad (10)$$

ersetzen ($m = tg\ \alpha$). Setzt die Thyroxinbehandlung bei Bereitschaftsbeginn ein ($A_e = A_b$), so ergibt sich aus Gl. (10) für die Latenzzeit der richtige Betrag λ_0. Da anzunehmen ist, dass sich die Latenzzeit innerhalb der Bereitschaftsperiode nur sehr langsam mit zunehmendem Behandlungsbeginn ändert, wird die Annäherung erster Ordnung offenbar mit guter Uebereinstimmung dem wahren Kurvenverlauf folgen. Unter dieser speziellen Bedingung wird die A_e, L-Beziehung im Altersintervall II durch eine schwach geneigte Gerade (Spezialfall A : $0 > m \geq -\ tg\ 20°$), durch eine langsam ansteigende Gerade (Spezialfall B : $0 < m \leq +\ tg\ 20°$) oder durch eine parallel zur Abszissenachse verlaufende Gerade (Spezialfall C : $m = 0$) dargestellt.

Der Gesamtverlauf der hypothetischen A_e, L-Abhängigkeit: Werden Behandlungsbeginn und Latenzzeit in denselben Zeitmassen angegeben, so lässt sich der hypothetische Verlauf der A_e, L-Beziehung bei Einhaltung der Voraussetzungen (1) bis (5) (siehe S. 93) zusammenfassend folgendermassen charakterisieren (siehe Darstellung des hypothetischen Gesamtverlaufs in Fig. 30):

1. In der A_e, L-Abhängigkeit lassen sich zwei Kurvenintervalle voreinander unterscheiden. Im ersten Kurvenabschnitt, der sich vom Fixpunkt der Altersskala ($A_0 = 0$) bis zum normogenetischen Bereitschaftsbeginn A_b erstreckt, nimmt die Latenzzeit mit steigendem Behandlungsbeginn linear ab unter Bildung des Neigungswinkels 135°, wenn Behandlungsbeginn und Latenzzeit im selben Zeitmass angegeben werden.

2. Im zweiten Kurvenabschnitt, der sich über die gesamte sensitive Phase erstreckt, nimmt die A_e, L-Abhängigkeit im allgemeinsten Fall die Gestalt einer schwach gekrümmten Linie an. Ihre Annäherung erster Ordnung ist entweder eine schwach geneigte oder langsam ansteigende Gerade. Im Grenzfall reduziert sich die krumme Linie zu einer Geraden, die im Abstand λ_0 parallel zur Abszissenaxe verläuft.

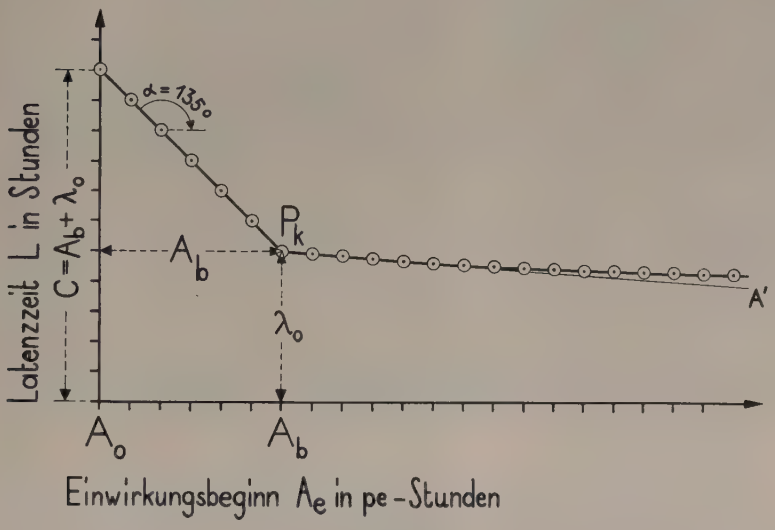


Fig. 30.

Hypothetischer Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit in den beiden Altersintervallen vor und nach dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn (A' = Annäherung erster Ordnung an den allgemeinen Kurvenverlauf im Altersintervall II für Spezialfall A).

3. Die den beiden Kurvenabschnitten entsprechenden Geraden schneiden sich unter Bildung eines Knickpunktes P_k, der je nach den speziellen Bedingungen mehr oder weniger markant hervortritt. Der Behandlungsbeginn, der gleich dem Abszissenwert dieses Knickpunktes ist, stimmt mit dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn überein [$x\ P_k = A_b$]. Der Abszissenwert des Knickpunktes hängt infolgedessen allein von den Bedingungen (Temperatur, Individuen-Raumdichte etc.) ab, unter denen die Behandlungsstadien aufgezüchtet worden sind; er ist unabhängig sowohl von der applizierten Thyroxin-Aussenkonzentration als auch

von der Wahl des Reaktionskriteriums, das zur Bestimmung der Latenzzeit verwendet wird. Die Latenzzeit LA_b, die gleich dem Ordinatenwert des Knickpunktes P_k ist, weist den Betrag der „Vorbereitungsphase bei Bereitschaftsbeginn" auf $[y\, P_k = \lambda_o]$.

Wenn die über den Ablauf des Induktionsvorganges entwickelten Vorstellungen richtig sind, die der Deduktion der A_e, L-Beziehung zugrundegelegten Annahmen (1) bis (5) dem Naturverhalten entsprechen und wenn es ferner gelingt, die Voraussetzungen (1) bis (5) im Experiment streng einzuhalten, dann wird die hypothetische Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit mit der empirisch ermittelten übereinstimmen. Ist dies der Fall, so lässt sich der normogenetische Bereitschaftsbeginn der verschiedenen Organe und Organanlagen anhand ihrer Testreaktionen aus der empirischen Lage des Knickpunktes P_k quantitativ bestimmen.

5. *Die empirische Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit.*

a) *Versuchsführung.*

Zur Ueberprüfung der hypothetischen A_e, L-Abhängigkeit wurden unter Einhaltung der auf S. 93 festgelegten Voraussetzungen verschieden alte Junglarven, Jungkaulquappen und Kaulquappen (bis in das Stadium der Kaulquappe mit Hinterextremitäten-Zäpfchen: Larven-Stadium Nr. 13) von *Rana temporaria* L. einer Normalzucht entnommen und der Dauerbehandlung durch eine Thyroxinlösung von definierter und überschwelliger Thyroxinkonzentration unterworfen. Unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität wurden pro Alterskategorie resp. Versuchsansatz je fünf gleichwertige Individuen unter fortlaufender Ausmessung mehrerer Messtrecken in ihrer Entwicklung und in ihren Reaktionen verfolgt. Daneben erfolgte die Aufzucht und Ausmessung von Kontrolltieren unter denselben Versuchsbedingungen.

Ausgangsmaterial und Ausgangsstadium. Das Versuchs-Ausgangsmaterial wurde aus einem Gelege von Andermatt (Versuch A 1947) und einem aus der Umgebung Basels entstammenden Laichballen (Versuch B 1949) aufgezüchtet. Als Ausgangsstadium diente die frühzeitig geschlüpfte Junglarve mit einer mittleren Schwanzlänge

von 1,1 mm (Larven-Stadium Nr. 1). Da die Embryonen ein- und desselben Laichballens nie gleichzeitig miteinander ihre Eihüllen verlassen, machen sich bei der Gewinnung des Ausgangsmaterials grössere individuelle Schwankungen im Entwicklungszustand bemerkbar. Um ein statistisch homogenes Ausgangsmaterial zu erhalten, wurde in diesem Versuch folgender Weg eingeschlagen: In Abständen von je zwei Stunden verbrachte ich die jeweils frisch geschlüpften Junglarven in einen Eiskasten und liess sie langsam auf eine Temperatur von 5 — 6° C abkühlen. Dort wurden die Larven solange in ihrer Weiterentwicklung zurückgehalten, bis genügend Individuen zur Verfügung standen, um den Versuch durchführen zu können (bei 22° C nach ca. 6 Stunden Schlüpfzeit). Das gesamte Ausgangsmaterial liess ich dann während weiteren 5 Stunden im Eiskasten stehen, damit sämtliche, auch die zuletzt in den Eiskasten verbrachten Individuen, dieselbe Vorbehandlung erfuhren. Vor Versuchsbeginn erfolgte die Ausscheidung aller Extremformen.

Thyroxinbehandlung. Die der Thyroxineinwirkung unterworfenen Larven standen dauernd unter dem Einfluss der konstant gehaltenen Thyroxin-Aussenkonzentration 1 : 2'000'000 (= 50 γ-%). Während der Thyroxinbehandlung erhielten Versuchs- und Kontrolltiere keine äussere Nahrungszufuhr und lebten somit ausschliesslich von ihren Dotter- und Nahrungsreserven. Dadurch wurde völlige Gleichheit der Ernährungsbedingungen in Versuchs- und Kontrolltieren während des Vesuchsablaufs erzielt (siehe S. 13).

b) *Versuchsauswertung.*

Die fortlaufende Ausmessung verschiedener Metamorphose-Grössen ermöglichte eine objektive Bestimmung der A_e, L-Abhängigkeit. Die regionalen Latenzzeiten wurden nach dem im zweiten Abschnitt (siehe S. 36) beschriebenen Verfahren mit den folgenden Reaktionskriterien ermittelt:

1. Dorsaler und ventraler Flossensaum (d = 1,65 mm auf der Schwanzlängsachse) . . . . . $r_R = 0{,}2$
2. Mediane und laterale Partie der Unterlippe . . . . . $r_R = 0{,}2$
3. Schwanzstamm . . . . . $r_R = 0{,}1$
4. Linkes Operkulum . . . . . $q_R = 3{,}0$
5. Hinterextremitätenanlagen . . . . . $w_R = 0{,}6$

Fig. 31 veranschaulicht in dreidimensionaler Darstellung die Methodik der objektiven Bestimmung der A_e, L-Abhängigkeit am Beispiel der Testreaktion des Schwanzstammes. Auf der X-Achse ist der Behandlungsbeginn in pe-Stunden, auf der Y-Achse die Zeit seit Behandlungsbeginn in Stunden und auf der Z-Achse die thyro-

xinverursachte Schwanzstamm-Reduktion in % aufgetragen. Die den verschiedenen Behandlungstadien (zwischen $A_e = 0$ und $A_e = 204$ pe-Stunden variierend) entsprechenden Reduktionscharakteristiken erscheinen in der dreidimensionslen Darstellung als parallel zur Y, Z-Ebene hintereinandergestaffelte Kurvenschar. Auffallend ist dabei die Regelmässigkeit, mit der die Resorption der zentralen Schwanzpartie bei den verschiedenen Behandlungsstadien erfolgt.

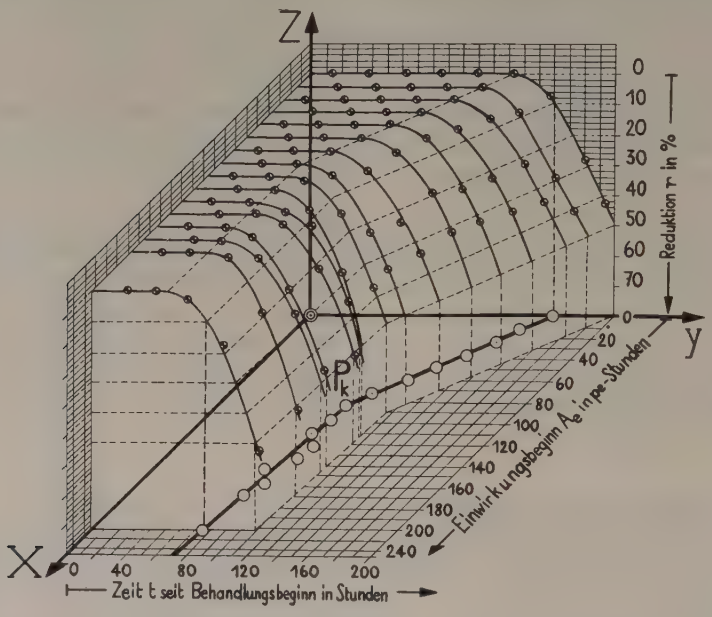


Fig. 31.
Dreidimensionale Veranschaulichung der objektiven Bestimmung der A_e, L — Abhängigkeit am Beispiel der Schwanzstamm-Reaktion.

Die Punkte gleicher Reduktionsquote (Reduktion $r = 0, 10, 20, 30, 40, 50\%$) sind durch fein gestrichelte Linienzüge miteinander verbunden. Werden frühe Entwicklungstadien resp. junge Larven, deren Alter zwischen $A = 0$ und ungefähr $A = 80$ pe-Stunden liegt, mit Thyroxin behandelt, so dauert es erwartungsgemäss länger als bei älteren Individuen, bis die Reduktion des Schwanzstammes einsetzt. Da als Reaktions-Kriterium der zentralen Schwanzpartie die Reduktion $r_R = 10\%$ gewählt wurde, stellt die Projektion der „10%-Höhenkurve“ in die X, Y-Ebene die gesuchte Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit dar.

Diese zeigt deutlich die beiden theoretisch zu erwartenden Kurvenanteile, die durch Geraden repräsentiert und durch den Knickpunkt P_k voneinander gesondert werden.

c) *Versuchsergebnisse.*

Die an den Testreaktionen der verschiedenen Anlagebezirke ermittelten A_e, L-Abhängigkeiten gelangen in den Fig. 32-36 zur

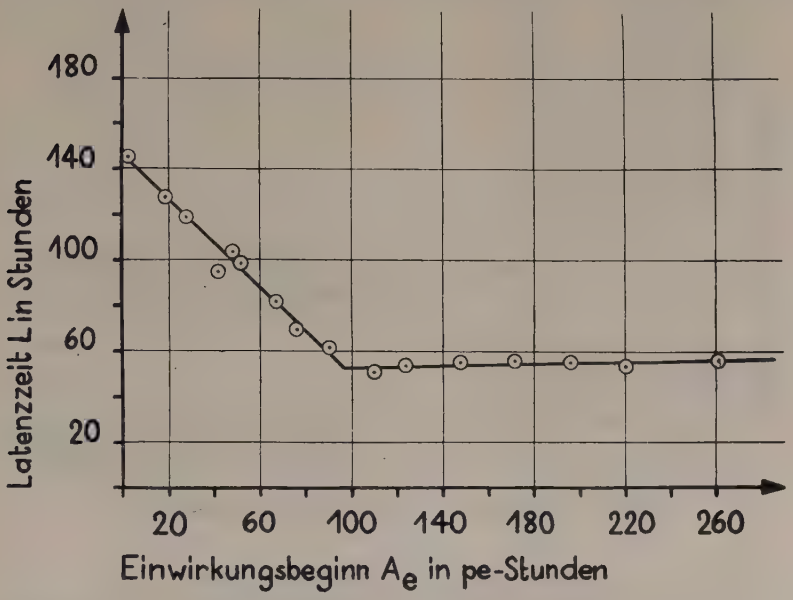


Fig. 32.
An der Testreaktion der Hinterextremitätenanlage ermittelter Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit (Versuch B 1949).

Darstellung. Der Fixpunkt der Altersskala bezieht sich auch hier auf jenes Alter, das demjenigen des Larvenstadiums Nr. 1 (vergl. Normentafel) entspricht. Die Latenzzeiten, die den dargestellten Kurven zugrundeliegen, sind stets aus 5 Einzelwerten gewonnene Mittelwerte. Allen Werten von L kommt daher dasselbe statistische Gewicht zu.

Der Verlauf der an der Testreaktion der Hinterextremitätenanlage ermittelten A_e, L-Abhängigkeit. Wie aus Fig. 32 hervorgeht, ändert sich die Latenzzeit erwartungsgemäss mit zunehmendem Einwirkungs-

beginn. Es lassen sich deutlich die beiden Kurvenabschnitte I und II voneinander unterscheiden, die durch einen markant hervortretenden Knickpunkt voneinander gesondert werden. Im ersten Kurvenabschnitt nimmt die Latenzzeit in Uebereinstimmung mit der Theorie linear ab. Die einzelnen Kurvenpunkte streuen nur

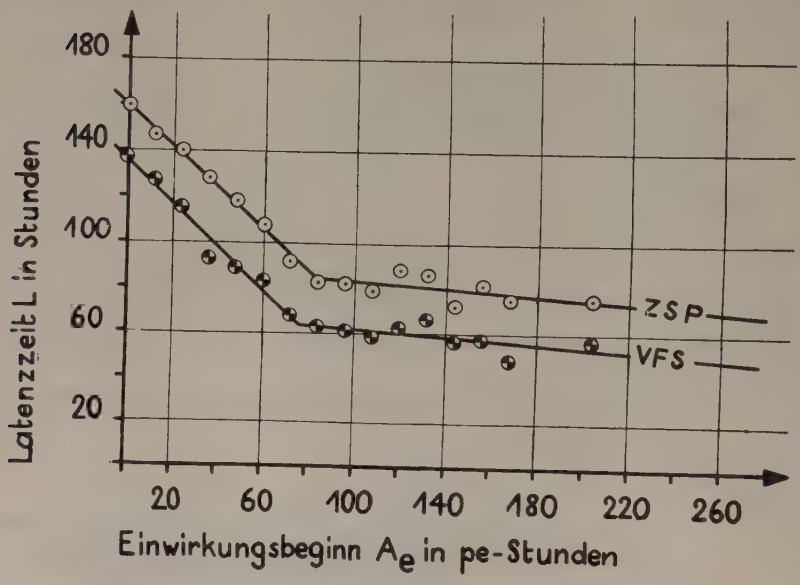


Fig. 33.

An den Testreaktionen des Schwanzstammes (ZSP) und des ventralen Flossensaumes (VFS) ermittelter Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit (Versuch A 1947).

geringfügig und unsystematisch um die Regressionsgerade (Streuung $s_L = \pm 4\%$ [1]). Aus der Gleichung der Regressionsgeraden errechnet sich ein Neigungswinkel von 136° 0', der von seinem hypothetischen Betrag nur unbeträchtlich abweicht. Das Kurvenintervall II, das sich über die gesamte Bereitschaftsperiode erstreckt, von dem wir aber nur den kleinen Ausschnitt zwischen $A_e = 100$ und $A_e = 261$ pe-Stunden untersucht haben, wird ebenfalls in Uebereinstimmung mit der Theorie durch eine Gerade dargestellt. Aus der Gleichung der Regressionsgeraden ergibt sich ein Steigungswinkel von 1° 16'.

[1] Die Streuung S_L in % bezieht sich stets auf den mittleren Betrag der Latenzzeit im betreffenden Altersintervall, der gleich 100% gesetzt wird.

Dieses Verhalten entspricht dem theoretisch zu erwartenden Spezialfall B (siehe S. 97).

Die an den Testreaktionen des Ruderschwanzes ermittelten A_e, L-Abhängigkeiten stimmen ebenfalls sehr gut mit dem hypothetischen Kurvenverlauf überein. Es können wiederum die den beiden Altersinter-

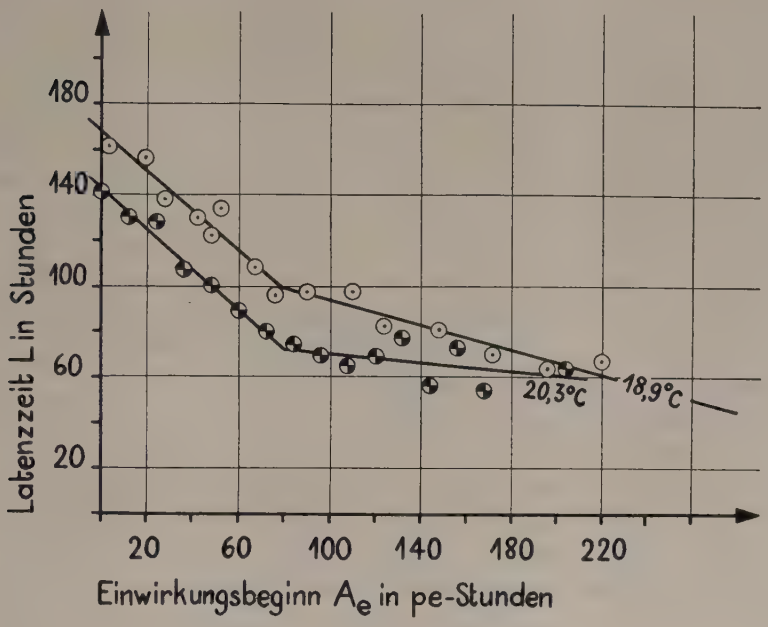


Fig. 34.

An der Testreaktion des dorsalen Flossensaumes ermittelter Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit bei verschiedenen Temperaturen ($t_1 = 18{,}9°$ C: Versuch B 1949; $t_2 = 20{,}3°$ C: Versuch A 1947).

vallen I und II entsprechenden, verschieden stark geneigten Geraden voneinander unterschieden werden, die sich unter Bildung markant hervortretender Knickpunkte schneiden. Die an den Testreaktionen des Schwanzstammes und des ventralen Flossensaumes ermittelten Abhängigkeiten (siehe Fig. 33) verlaufen parallel zueinander in einem bestimmten Abstand verschoben, da die Rückbildung der zentralen Schwanzpartie stets erst längere Zeit nach derjenigen des Flossensaumes einsetzt. Fig. 34 stellt den am dorsalen Flossensaum ermittelten Kurvenverlauf

bei zwei verschiedenen Temperaturen dar. Im Kurvennterivall I ergibt sich aus der den Schwanzstamm betreffenden Regressionsgeraden ein Neigungswinkel von 137° 40', der um 2% von seinem hypothetischen Wert abweicht. Anhand der Testreaktion des ventralen Flossensaumes erhalten wir den Neigungswinkel 136° 20', der nur um 1% vom zu erwartenden Winkel differiert. Beim dorsalen Flossensaum weichen die im Kurvenintervall I erhaltenen

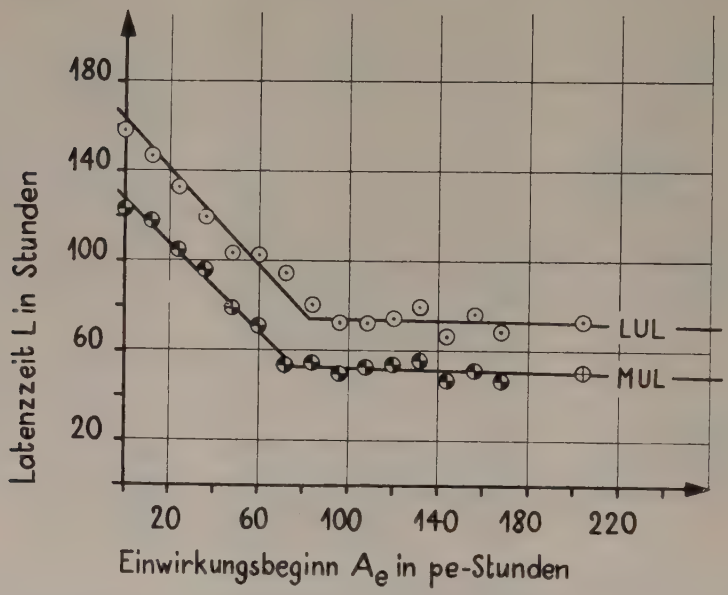


Fig. 35.

An den Testreaktionen der medianen Unterlippenpartie (MUL) und der lateralen Unterlippenpartie (LUL) bestimmter Verlauf der A_e, L-Abhängigkeit (Versuch A 1947).

Neigungswinkel ($t_1 = 18{,}9°$ C: $\alpha = 138° 54'$; $t_2 = 20{,}3°$ C: $\alpha = 138° 55'$) bei beiden Temperaturen um ca. 4° vom Wert 135° ab. Im Kurvenintervall II nimmt die Abhängigkeit für alle geprüften Reaktionen des Ruderschwanzes die Gestalt schwach geneigter Geraden an. Die Latenzzeit des Schwanzmaterials nimmt entsprechend dem theoretisch begründeten Spezialfall A mit steigendem Behandlungsbeginn langsam, aber deutlich ab. Aus den Gleichungen der Regressionsgeraden errechnen sich für Schwanzstamm und Flossensaum Neigungswinkel, deren Werte zwischen 164° 50' und

175° 10′ variieren. Sie liegen somit innerhalb den theoretischen Schranken.

Die an den Reaktionen der Unterlippe ermittelten A_e, L-Abhängigkeiten gelangen in Fig. 35 zur Darstellung. In Uebereinstimmung mit der Theorie nimmt die Latenzzeit im Kurvenintervall I mit steigendem Behandlungsalter linear ab unter Bildung von Neigungswinkeln, deren Beträge geringfügig und unsystematisch vom theoretischen Wert abweichen. Im zweiten, sich über die Bereitschaftsperiode erstreckenden Kurvenintervall ändert sich die Latenzzeit erwartungsgemäss nur noch unbeträchtlich mit steigendem Einwirkungsbeginn. Die beiden A_e, L-Kurven verlaufen parallel zueinander gestaffelt in einem Abstand von ungefähr 24 Stunden. Dieses Verhalten illustriert den bereits früher erwähnten Befund, dass die Rückbildung der medianen Unterlippenpartie stets einige Zeit vor derjenigen der lateralen Partien einsetzt. Im Kurvenintervall I ergibt sich für die an der lateralen Unterlippenpartie ermittelte A_e, L-Abhängigkeit eine Regressionsgerade mit einem Neigungswinkel von 133° 10′, für die an der medianen Unterlippenpartie ermittelte Abhängigkeit eine Regressionsgerade mit einem Neigungswinkel vom Betrag 135° 50′. Im Kurvenintervall II nimmt die Latenzzeit wie bei Schwanzstamm und Flossensaum mit zunehmendem Behandlungsbeginn stetig ab (theoretischer Spezialfall A). Aus den Gleichungen der Regressionsgeraden errechnen sich Neigungswinkel, die der hypothetischen Einschränkung genügen (laterale Partie der Unterlippe: $\alpha = 178° 50′$; mediane Partie der Unterlippe: $\alpha = 178° 30′$).

Die anhand der Testreaktionen des unteren Hornkiefers und des linken Operkulums ermittelten A_e, L-Abhängigkeiten entsprechen ebenfalls dem theoretisch zu erwartenden Kurvenbild (siehe Fig. 36). Die zwischen 80 und 90 pe-Stunden liegenden Knickpunkte treten auch hier deutlich hervor. Aus der im Altersintervall I ermittelten Gleichung der Regressionsgeraden ergibt sich für den unteren Hornkiefer ein Neigungswinkel von 138°, der um 2,2% vom hypothetischen Winkel abweicht. Die das linke Operkulum betreffende Regressionsgerade weist einen Neigungswinkel von 137° 20′ auf, der 1,7% grösser als der theoretische Winkel ist. Die Streuung der Kurvenpunkte ist eine ausgesprochen geringfügige;

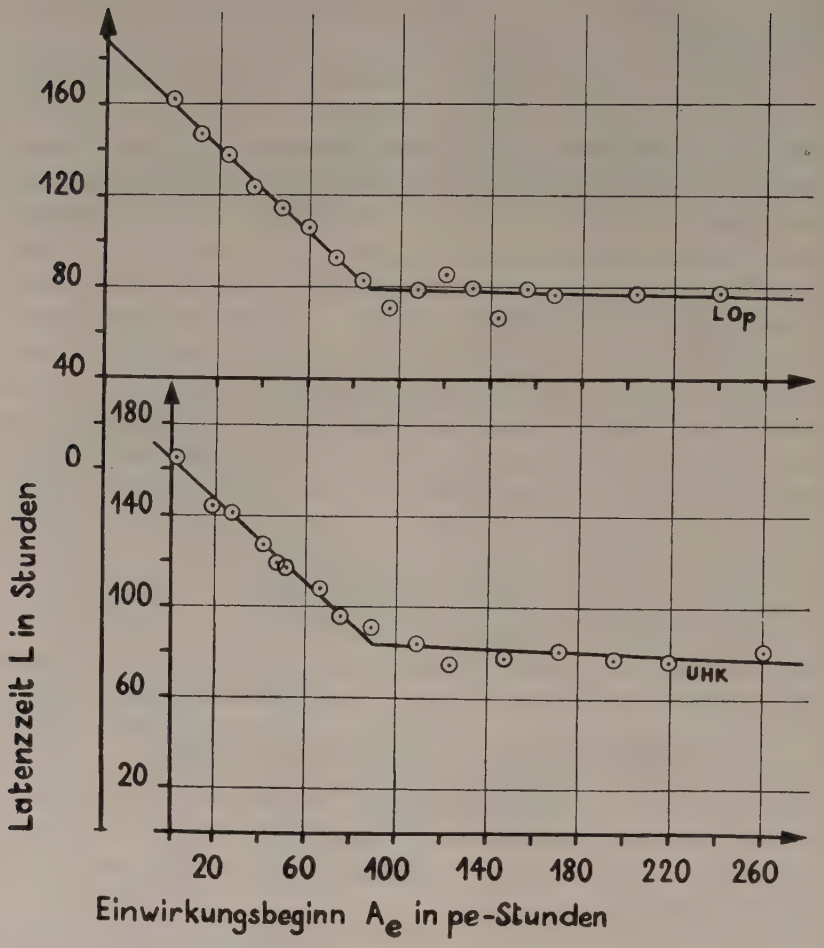


FIG. 36.

An den Testreaktionen des linken Operkulums (LOp, Versuch A 1947) und des unteren Hornkiefers (UHK, Versuch B 1949) ermittelter Verlauf der A_e, L — Abhängigkeit.

sie beträgt beim linken Operkulum im Altersintervall I nur $s_L = \pm 1{,}6$ St. $= \pm 2\%$. Im Kurvenabschnitt II nimmt die Latenzzeit des unteren Hornkiefers und des Operkulums nur sehr langsam mit zunehmendem Einwirkungsbeginn ab (theoretischer Spezialfall A). Die aus den Regressionsgeraden errechneten Neigungswinkel von 178° 0′ (unterer Hornkiefer) und 178° 50′ (linkes Operkulum) liegen weit innerhalb den hypothetischen Schranken.

6. *Zusammenfassung zur theoretischen und experimentellen Analyse der Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit.*

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Resultat: Die experimentell gefundene Abhängigkeit zwischen Einwirkungsbeginn und Latenzzeit erweist sich in Uebereinstimmung mit dem theoretischen Befund als eine aus zwei Kurvenanteilen zusammengesetzte. Es lassen sich in allen Fällen die beiden Kurvenintervalle I und II, die sich über die Altersabschnitte vor und nach dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn erstrecken, deutlich voneinander unterscheiden. Im ersten Kurvenintervall nimmt die Latenzzeit entsprechend dem hypothetischen Verlauf linear ab unter Bildung von Neigungswinkeln, die von ihrem theoretischen Wert meist nur geringfügig abweichen. Die im Kurvenintervall I ermittelten Regressionskoeffizienten variieren zwischen $b_I = -0{,}872$ und $b_I = -1{,}068$, streuen also unsystematisch um den theoretischen Wert $\beta_I = -1$. Ihre durchschnittliche Abweichung vom idealen Wert beträgt $\overline{D} = 7{,}5\%$. Ihr Durchschnittwert $\overline{b}_I = -0{,}936$ weicht aber nur um 6,4% vom hypothetischen Betrag ab. Die statistische Auswertung der experimentellen Daten anhand der Verteilung von t (siehe Linder, 1945, S. 63) zeigt, dass die Abweichungen der experimentell gefundenen Regressionskoeffizienten von ihrem theoretischen Wert $\beta_I = -1$ in jedem Falle unwesentliche sind, d. h. als zufällig entstandene zu betrachten sind, wenn übereinkunftsgemäss $P = 0{,}05$ als Sicherheitsschwelle verwendet wird. Im Kurvenabschnitt II ändert sich die Latenzzeit ebenfalls in Uebereinstimmung mit dem theoretischen Kurvenverlauf nur sehr langsam mit zunehmendem Behandlungsbeginn. Die den normogenetischen Bereitschaftsbeginn markierenden Knickpunkte treten daher in allen A_e, L-Kurven deutlich hervor. Da wir stets einen im Verhältnis zur sensitiven Phase als klein zu betrachtenden Ausschnitt des Altersintervalls II untersucht haben, nimmt die A_e, L-Funktion in diesem Kurvenabschnitt die Gestalt schwach geneigter, langsam ansteigender oder nahezu parallel zur Abszissenachse verlaufender Geraden an. Die im Kurvenintervall II ermittelten Regressionskoeffizienten variieren zwischen $b_{II} = -0{,}2707$ und 0,0393, liegen somit alle innerhalb den hypothetisch angenommenen Schranken.

7. *Die experimentelle Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns.*

Die Uebereinstimmung zwischen dem mathematisch abgeleiteten und dem experimentell gefundenen Verlauf der A_e, L-Beziehung ermöglicht es uns, den normogenetischen Bereitschaftsbeginn A_b aus der empirischen Lage des Knickpunktes P_k zu ermitteln. Wird die Latenzzeit auf der Ordinate, der Behandlungsbeginn auf der Abszissenachse aufgetragen, so muss der Abszissenwert des in der A_e, L-Abhängigkeit auftretenden Knickpunktes nach der Theorie mit dem normogenetischen Bereitschaftsbeginn identisch sein. Der wahrscheinlichste Wert des normogenetischen Bereitschaftsbeginns ist daher gleich dem Abszissenwert des Schnittpunktes, den die Regressionsgerade des Altersintervalls I [$L = b_I A_e + C$] mit derjenigen des Altersintervalls II [$L = b_{II} (A_e - A_b) + \lambda_o$] bildet. Der auf diesem Weg ermittelte Bereitschaftsbeginn erweist sich in Uebereinstimmung mit der Theorie als völlig unabhängig von der Festlegung des Reaktionskriteriums, das wir zur Bestimmung der Latenzzeit verwenden. So ergibt sich beispielsweise aus der anhand der Testreaktion der Hinterextremitätenanlagen ermittelten A_e, L-Abhängigkeit innerhalb den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode derselbe Bereitschaftsbeginn, ob nun die Wachstumsförderung $w_R = 0{,}3$ oder 0,6 resp. $w_R = 0{,}4$ oder 0,6

Tabelle III.

Versuch	Reaktionskriterium der Hinterextremitätenanlage	Normogenetischer Bereitschaftsbeginn der Hinterbeinknospe
A1947	$w_R = 0{,}3$	$A_b = 103$ pe-Stunden
	$w_R = 0{,}6$	$A_b = 101$ pe-Stunden
B1949	$w_R = 0{,}4$	$A_b = 87$ pe-Stunden
	$w_R = 0{,}6$	$A_b = 88$ pe-Stunden

als Reaktionskriterium der Hinterextremitätenanlage definiert wird (siehe Tab. III).

8. *Das zeitliche Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft bei* Rana temporaria *L.*

Unter Einhaltung der Aufzuchtbedingungen, die wir der Normentafel zugrundegelegt haben (Temperatur $t = 20{,}3 \pm 0{,}3°$ C; Individuen-Raumdichte $d_i = 5$ Indiv./45 ccm; Aufzuchtmilieu = Basler Brunnenwasser; Ernährung: Bis in das Alter von 108 pe-Stunden durch autochthone Dotterreserven, darnach dauernde Verfütterung von Brennesselpulver), erhalten wir für den normogenetischen Bereitschaftsbeginn verschiedener Anlagebezirke von *Rana temporaria*-Larven die in Tab. IV zusammengestellten Stundenalter.

Tabelle IV.

Anlagebezirk	Symbol	Normogenet. Bereitschaftsbeginn in pe-Stunden		
		Vers. A 1947	Vers. B 1949	Mittel-resp. Einzelwert der Versuche A, B
Ventraler Flossensaum, $d = 1{,}65$ mm	E	76	71	*74*
Dorsaler Flossensaum, $d = 1{,}65$ mm	F	81	70	*76*
Unterlippe, median . .	B	76	—	*76*
Oberer Hornkiefer . . .	C	78	—	*78*
Schwanzstamm	J	83	79	*81*
Unterer Hornkiefer . .	D	—	82	*82*
Unterlippe, lateral . . .	G	82	—	*82*
Linkes Operkulum . . .	H	87	—	*87*
Hinterextremitätenanlage	A	101	88	*95*

Aus dieser Zusammenstellung geht zunächst hervor, dass der normogenetische Bereitschaftsbeginn ein regionalspezifischer ist (vergl. Champy und Radu, 1931). Der Bereitschaftszustand etabliert sich nicht gleichzeitig in sämtlichen zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirken; die verschiedenen Organe und Organanlagen erlangen die Thyroxinempfindlichkeit in einer ganz bestimmten Sukzession, die wir als zeitliches Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft kennzeichnen wollen. So gelan-

gen unter den von mir untersuchten Körperpartien zuerst der ventrale und dorsale Flossensaum, die mediane Partie der Unterlippe und ungefähr gleichzeitig der obere Hornkiefer in den Zustand, in dem sie auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen. Ungefähr 5—6 Stunden später etabliert sich die Thyroxinempfindlichkeit im Schwanzstamm, im unteren Hornkiefer und in der lateralen Partie der Unterlippe. Das linke Operkulum folgt der zentralen Schwanzpartie in einem Abstand von weiteren 6 Stunden. Unter den von mir untersuchten Anlagebezirken gelangen die Hinterextremitätenknospen zuletzt in den Zustand der Thyroxinempfindlichkeit.

Wenngleich die Reihenfolge, in der die verschiedenen Anlagebezirke in Reaktionsbereitschaft treten, infolge der auftretenden Streuungen des Bereitschaftsbeginns und der geringen Zahl der Versuche im Einzelnen nicht sehr scharf bestimmt werden konnte, so geht doch eindeutig aus den in Tab. IV zusammengestellten Zahlen hervor, dass die Thyroxinempfindlichkeit zuerst in den transitorischen Körperbezirken zustandekommt und sich erst nachträglich in der Anlage des Adultorganes etabliert. Dieses Verhalten hängt zweifellos mit dem Unterschied zusammen, der zwischen dem Differenzierungsbeginn der Organanlagen mit larvaler Bestimmung einerseits und demjenigen der Organanlagen mit adulter Bestimmung andererseits besteht. Während der Embryogenese entstehen bei Arten mit indirekter Entwicklung im Hinblick auf das unmittelbar bevorstehende larvale Dasein stets zuerst die Anlagen der larvalen und der larvo-adulten Organe, demgegenüber ist die Differenzierung der für die Larve funktionell bedeutungslosen Anlagen der Adultorgane (Extremitäten- und Zungenanlage) stark verzögert.

Anhand von Fig. 37 lässt sich der allgemeine Entwicklungszustand der Larve, der bei Standardbedingungen mit dem Einsetzen der Reaktionsbereitschaft verknüpft ist, eruieren. Im oberen Abschnitt der Darstellung sind die normogenetischen Bereitschaftsperioden der verschiedenen Körperbereiche durch schraffierte Bänder markiert, die über die rechte Seite der Figur hinaus stark verlängert gedacht werden müssen. Im unteren Abschnitt der Darstellung sind die entsprechenden Stadien, Ereignisse und Phasen der frühlarvalen Normogenese eingetragen. Aus Fig. 37 geht hervor,

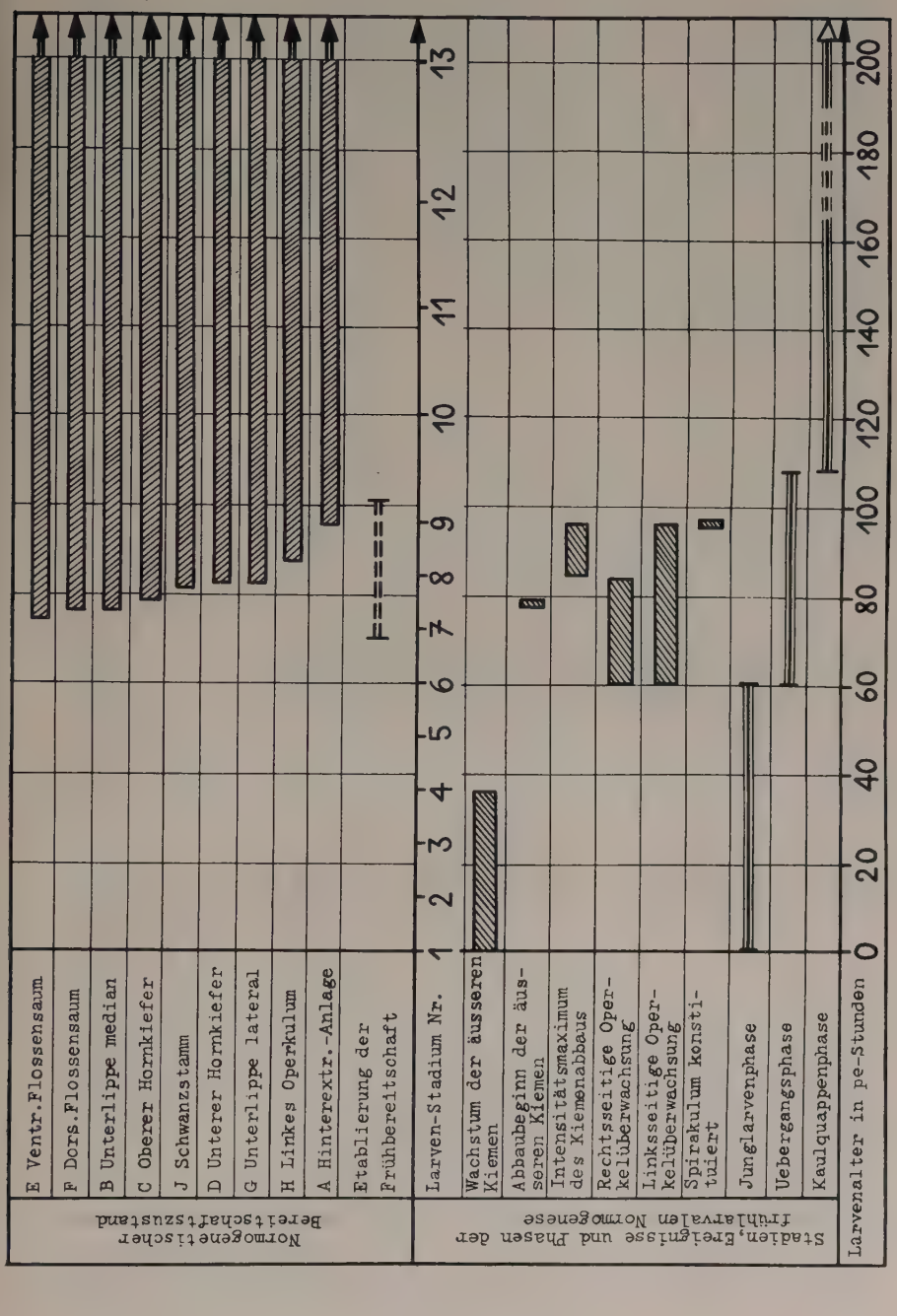


FIG. 37. — Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft bei *Rana temporaria*.

dass sich die Reaktionsbereitschaft in Uebereinstimmung mit der früher geäusserten Ansicht vor dem Zustandekommen des typischen Jungkaulquappen-Stadiums (Larven-Stadium Nr. 10) konstituiert. Flossensaum und mediane Partie der Unterlippe erlangen die Reaktionsbereitschaft bereits in einem Entwicklungsstadium, in dem die Larve noch beidseitig äussere Kiemen trägt. Die Operkelüberwachsung ist deutlich in Gang gekommen, am Rande der Unterlippe hat sich der Lippensaum gebildet und die Hinterextremitätenanlagen beginnen sich als kleine Hautauswölbungen von ihrer Umgebung abzugrenzen. Schwanzstamm und unterer Hornkiefer werden thyroxinempfindlich, wenn die Reduktion der äusseren Kiemen stürmisch zu verlaufen beginnt. Die rechte äussere Kieme ist auf dieser Altersstufe in den meisten Fällen vollständig von der Operkularfalte überwachsen; auf der linken Körperhälfte hingegen ragt die äussere Kieme aus dem sich bildenden Atemporus hervor. Die Verhornung der Kieferränder ist so weit fortgeschritten, dass sie äusserlich nachgewiesen werden kann. In den Hinterextremitätenanlagen konstituiert sich die Reaktionsfähigkeit auf Schilddrüsenstoffe erst dann, wenn sich das Spirakulum auf der linken Körperseite gebildet hat, der Abbau der Haftdrüsen deutlich erkennbar einsetzt und auf den Kammplatten der Unterlippe die ersten Hornzähnchen erschienen sind (Larven-Stadiums Nr. 9). Bei Larven von *Rana temporaria* L. etabliert sich demnach die Reaktionsbereitschaft in den von mir untersuchten Körperbereichen bereits während jener Normogenese-Phase, die durch den Uebergang von der maximal entwickelten Junglarve in die Jungkaulquappe gekennzeichnet ist (Uebergangsphase). Die Auffassung von Bounhiol (1942) und Roth (1945), wonach die Reaktionsfähigkeit auf Schilddrüsenstoffe erst dann in der Anurenlarve zustandekommt, wenn sich das Operkulum konstituiert hat und die äusseren Kiemen geschwunden sind, entspricht somit nicht genau dem Naturverhalten.

Die verschiedenen Körperbereiche, deren normogenetischen Bereitschaftsbeginn ich mit Hilfe eines indirekten Verfahrens ermittelt habe, bestehen stets aus mehreren Teilstrukturen, die sich nicht nur histologisch, sondern meist auch ihrer ontogenetischen

Herkunft nach voneinander unterscheiden. So sind z. B. am Aufbau des Schwanzstammes einerseits die vom mittleren Keimblatt abstammenden Muskel- und Bindegewebe, andererseits die aus dem Ektoderm hervorgehenden Nervengewebe des Rückenmarks beteiligt. Wir wissen nun in keinem Falle, ob die verschiedenen Teilstrukturen eines solchen Körperteils simultan oder sukzessive ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Thyroxinreiz erlangen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass der von mir ermittelte Bereitschaftsbeginn lediglich einen mittleren Wert für die in Reaktionsbereitschaft tretenden Teilstrukturen des betr. Körperteils darstellt.

Einer kritischen Prüfung bedarf der Bereitschaftsbeginn, der für das linke Operkulum ermittelt wurde. Es muss die Möglichkeit ins Auge gefasst werden, dass der anhand der Testreaktion des Operkulums ermittelte Bereitschaftsbeginn sich vielleicht überhaupt nicht auf dieses Organ selbst, sondern auf benachbarte Körperpartien bezieht, die für das Metamorphose- Verhalten des Operkulums bestimmend sind. Während die übrigen Körperbereiche (Teile des Ruderschwanzes und der Mundbewaffnung, Hinterextremitätenanlagen), deren normogenetischen Bereitschaftsbeginn ich anhand ihrer Testreaktionen ermittelt habe, unabhängig voneinander und von ihrer Lage im Gesamtorganismus und somit unter dem direkten Einfluss des Schilddrüsenreizes zur Metamorphose-Reaktion veranlasst werden (siehe Abschnitt II, S. 38-40), scheint die Histolyse des Operkulums durch eine indirekte Thyroxinwirkung zustandezukommen. Alphonse und Baumann (1935) konnten nachweisen, dass das branchiale Blutgefässsystem der Anurenlarve in spezifischer Weise auf das Thyroxin anspricht. Dabei werden die vom 5. und 6. Aortenbogen abstammenden Blutgefässe, die das Operkulum versorgen, abgebaut. Auf Grund eingehender histologischer und experimenteller Studien gelangen die zitierten Autoren zur Auffassung, dass die Einschmelzung des Operkulums nicht durch direkte Wirkungen des Thyroxins auf dasselbe induziert werde, sondern eine Nekrobiose darstelle, die durch den Unterbruch in der Blutgefässversorgung verursacht wird: „... Tous ces résultats nous montrent que la rupture de l'opercule branchial en métamorphose accélérée par la thyroxine constitue un cas particulier de dégénérescence secondaire aux troubles vasculaires“ (Alphonse und Baumann, 1935). Sollte sich

diese Ansicht in der Folge als richtig erweisen, so müsste der anhand der Testreaktion des linken Operkulums ermittelte Bereitschaftsbeginn auf das branchiale Blutgefässsystem bezogen werden.

Wenn wir das zeitliche Anlagemuster der Reaktionsbereitschaft mit dem in Fig. 25 (siehe S. 81) dargestellten Reaktionsmuster der Thyroxin-Frühmetamorphose vergleichen, so erkennen wir, dass die verschiedenen Körperterritorien der Anurenlarve nach einer auf embryonaler oder frühlarvaler Entwicklungsstufe einsetzenden Thyroxin-Dauerbehandlung nicht in derselben Reihenfolge „in Metamorphose treten", in der sie die Reaktionsfähigkeit auf den Schilddrüsenreiz erlangen. Dieser Unterschied beruht darauf, dass für das Reaktionsmuster der Thyroxin-Frühmetamorphose nicht nur der regional unterschiedliche Bereitschaftsbeginn, sondern auch die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit, mit der die verschiedenen Anlagebezirke beim Zustandekommen ihrer Thyroxinempfindlichkeit auf einen definierten Thyroxinreiz ansprechen, bestimmend ist.

9. *Die Abschätzung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns bei veränderter Aufzuchttemperatur.*

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Reaktionsbereitschaft in einer bestimmten Körperpartie etabliert, hängt entsprechend der Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven in starkem Masse von der Aufzuchttemperatur ab. Da wir einerseits den normogenetischen Bereitschaftsbeginn bei der Standardtemperatur 20,3° C, anderseits die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese (siehe S. 76) kennen, lässt sich der Bereitschaftsbeginn für beliebige Temperaturen zwischen 12° und 20° C (Bereich, in dem die Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese durch eine konstante Aktivierungsenergie vom Betrag $E_a = 21'000$ cal/Mol ausgezeichnet ist) nach dem Temperaturgesetz von ARRHENIUS berechnen. Diese Abschätzungsmethode setzt voraus, dass Bereitschaftsetablierung und frühlarvale Normogenese synchron verlaufende Prozesse sind.

D. Normogenetischer Bereitschaftsbeginn und Differenzierungszustand der Anlagebezirke.

Im vorangehenden Abschnitt konnte ich zeigen, dass sich die Thyroxinempfindlichkeit bei definierten Aufzuchtbedingungen auf einer scharf determinierten Altersstufe in einem bestimmten Anlagebezirk etabliert. Dieser Altersstufe, die nicht für alle in Reaktionsbereitschaft tretenden Körperbereiche diesselbe ist, entspricht ein jeweils charakteristischer Entwicklungszustand der Larve. Eine zur Reaktionsbereitschaft determinierte Organanlage mit larvaler, adulter oder larvo-adulter Bestimmung muss demzufolge erst einen ganz bestimmten „Zustand minimaler Differenzierung“ (Bounhiol, 1942) erfahren, bevor sie auf eine frühzeitig verabreichte Thyroxindosis ansprechen kann. Die genaue Kenntnis des normogenetischen Bereitschaftsbeginns ermöglicht es uns, diesen minimalen Differenzierungsgrad der zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke zu ermitteln und zu beschreiben.

1. *Das Verhalten des Hornkiefers.*

Die am Aufbau des Kaulquappen-Mundes beteiligten Partien haben wir bereits im zweiten Kapitel kurz erwähnt. Die eingehende Darstellung ihrer Struktur findet sich in den Untersuchungen von Schulze (1869), Héron-Royer und van Bambeke (1889) und Keiffer (1889). Ihre Frühentwicklung schildert Gutzeit (1889).

Der Hornkiefer der Kaulquappe besteht aus einem verdickten und sich nach aussen hin scharf zuspitzenden Epithelwulst. In diesen sind bei der vollentwickelten Kaulquappe dicht aneinandergestellte Zahnstifte eingesenkt (siehe Fig. 38). Diese säulenförmigen „Stiftzähne“ bestehen aus reihenweise übereinander getürmten „Zahnzellen“, die von indifferenten Epithelzellen umgeben sind. Die obersten Elemente der einzelnen Zahnstifte durchbrechen die stark verhornten äussersten Schichten des Epithels und verleihen dem Rand des Hornschnabels die Gestalt einer Säge. Die fertig ausgebildete Zahnzelle nimmt die Form eines Hohlkegels an, dessen „Konkavität von der Spitze der nächst jüngeren Zelle eingenommen wird“ (Goeppert, 1906). Die obersten Zahnzellen unterliegen der vollkommenen Verhornung und ihr Kern degeneriert.

Innerhalb ein und desselben Stiftzahnes lässt sich die fortschreitende Differenzierung der sich von der basalen Keimschicht abschnürenden Elemente in die fertig ausgebildete, aus dem Epithel hervorragende Zahnzelle verfolgen.

Beim Zustandekommen der Thyroxinempfindlichkeit repräsentiert der Hornkiefer einen Differenzierungszustand, in dem die

Fig. 38.
Rana temporaria. Differenzierungszustand des Hornkiefers einer maximal entwickelten Kaulquappe.

charakteristischen Histostrukturen seines spätlarvalen Zustandes (Stiftzahn und Hornschichten) bereits angelegt sind. Fig. 39 stellt den Differenzierungszustand des unteren Hornkiefers beim Einsetzen der Reaktionsbereitschaft dar. Der Verhornungsprozess, von dem schliesslich weite Partien des äusseren Epithels erfasst werden, ist in Gang gekommen, aber noch nicht sehr weit gediehen. Der Hornbelag des Kiefers ist, verglichen mit seinem Spätzustand, noch sehr dünn. Der bereits aus vielen Elementen aufgebaute Stiftzahn sondert sich deutlich von den indifferenten Epithel-

zellen ab. Die mittleren und oberen Zahnzellen zeigen bereits die charakteristische Hohlkegelstruktur. Das oberste Element des Stiftzahnes ist fast vollständig verhornt und beginnt mit seiner Spitze die äusserste Epithelschicht zu durchstossen. Die verhornenden Epithelzellen des Kieferrandes haben Spindelform angenommen und beginnen sich deutlich von ihren benachbarten Zellen abzugrenzen.

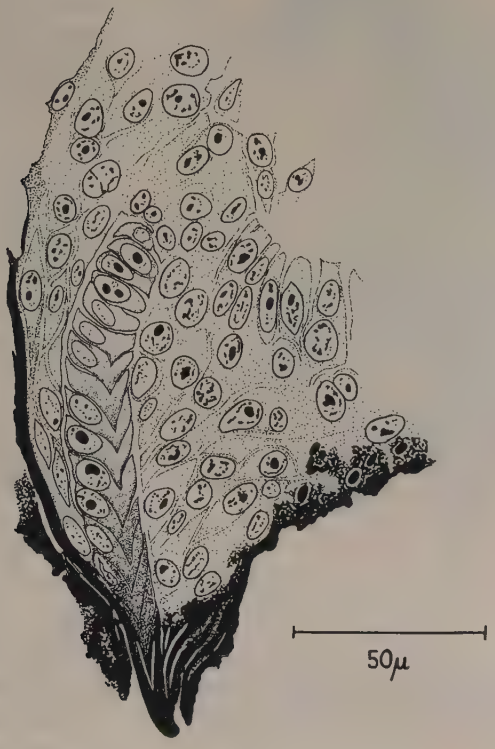


Fig. 39.

Rana temporaria. Differenzierungszustand des Hornkiefers beim Zustandekommen seiner Thyroxinempfindlichkeit.

2. *Das Verhalten der Unterlippe.*

Die Unterlippe der Anurenlarve stellt eine Hautausstülpung dar, die von lockerem Bindegewebe ausgefüllt und von Blutkapillaren durchzogen ist. Auf ihrer Oberseite verlaufen mehrere quergestellt Wülste, die sogenannten Kammplatten oder „lâmes pectinées“,

deren Zahl und Anordnung sich als eine artspezifische erweist (Héron-Royer und van Bambeke, 1889). Die Unterlippe der maximal entwickelten *Rana temporaria*-Kaulquappe ist durch vier hintereinander gestaffelt verlaufende Kammplatten gekennzeichnet (siehe Fig. 40). Distal wird die Unterlippe durch einen Papillarkranz, den Lippensaum begrenzt. Die Kammplatten entstehen durch eine an bestimmten Stellen erfolgende Verdickung des Lippenepithels. In den Kammplatten sind ähnlich wie beim Hornschnabel reihenweise „Stiftzähnchen" eingesenkt, die sich aus säulenförmig übereinandergetürmten „Zahnzellen" aufbauen (siehe Fig. 41). Das äusserste Element des Zahnstiftes überragt die benachbarten Epithelzellen, die hier in viel geringerem Masse von der Verhornung erfasst werden als die Epithelzellen der Kieferränder.

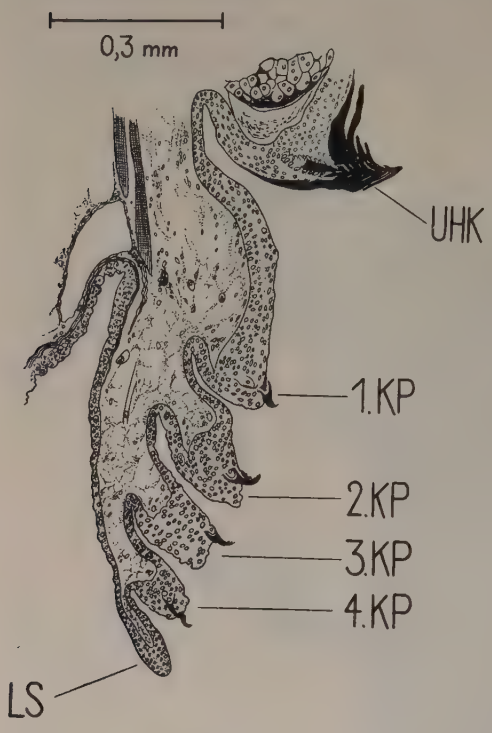


Fig. 40.
Rana temporaria. Differenzierungszustand der Unterlippe (mediane Partie) einer maximal entwickelten Kaulquappe (UHK = unterer Hornkiefer, KP = Kammplatten, LS = Lippensaum).

Die fertig ausgebildete Zahnzelle der Kammplatten weist an ihrer Basis eine starke Einbuchtung auf, der sich die nächstjüngere Zelle fest anschmiegt. Die hackenförmig gebogene Spitze der vollkommen verhornten Zahnzellen ist mit mehreren Zacken bewehrt. Auch hier erfolgt innerhalb des Zahnstiftes ein ständiger Nachschub neuer Elemente aus der an der Epithelbasis lokalisierten Keimschicht.

Vergleichen wir nun den spätlarvalen Zustand der Unterlippe

mit dem Differenzierungszustand, den sie bei Bereitschaftsbeginn aufweist (siehe Fig. 42). Einige Stunden vor dem Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Thyroxinreiz gelangt die Unterlippe (mediane Partie) in einen Entwicklungszustand, der durch die Ausbildung der ersten drei Kammplatten gekennzeichnet ist. Aus der noch undifferenzierten Partie der Unterlippe gehen später die vierte Kammplatte und der Lippensaum hervor. Die oberste Epithelschicht, die auf dieser Altersstufe die Kammplatten noch allseitig überspannt, trägt einen feinen Cuticularsaum. Die zentrale, lockere Bindegewebeschicht der Unterlippe ist indessen bereits von Blutkapillaren durchdrungen. Im Cytoplasma der Epithelzellen finden sich noch vereinzelte Dotterkörner. In den Kammplatten, von deren feinerer Struktur uns Fig. 43 ein Bild vermittelt, haben sich bei Bereitschaftsbeginn die Anlagen der Stiftzähne als diskrete Zellsäulen vom indifferenten Material abgesondert. Die charakteristische Form der Kammplatten-Zahnzelle ist hier aber selbst bei den obersten Elementen der Stiftzahnanlage noch nicht erkennbar. Die einzelnen Zahnzellen zeigen die für den Frühzustand typische Quaderform mit dem relativ grossen, ovoidförmigen Kern.

Fig. 41.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der Kammplatte einer maximal entwickelten Kaulquappe.

3. *Das Verhalten der zentralen Schwanzpartie.*

Unter den Teilstrukturen des Schwanzstammes, die im Bereitschaftszustand elektiv auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen, beschränken wir uns auf die Darstellung des Verhaltens der Muskulatur und des Axenskelettes.

Die Schwanzmuskulatur der Kaulquappe zeigt einen metameren Aufbau. Die in Längsrichtung parallel und spiegelbildlich zueinander verlaufenden Muskelfasern inserieren mit ihren beiden Enden an den Myosepten. Die einzelne Muskelfaser baut sich aus dem undifferenzierten Cytoplasma, den Muskelkernen und den in Bündeln

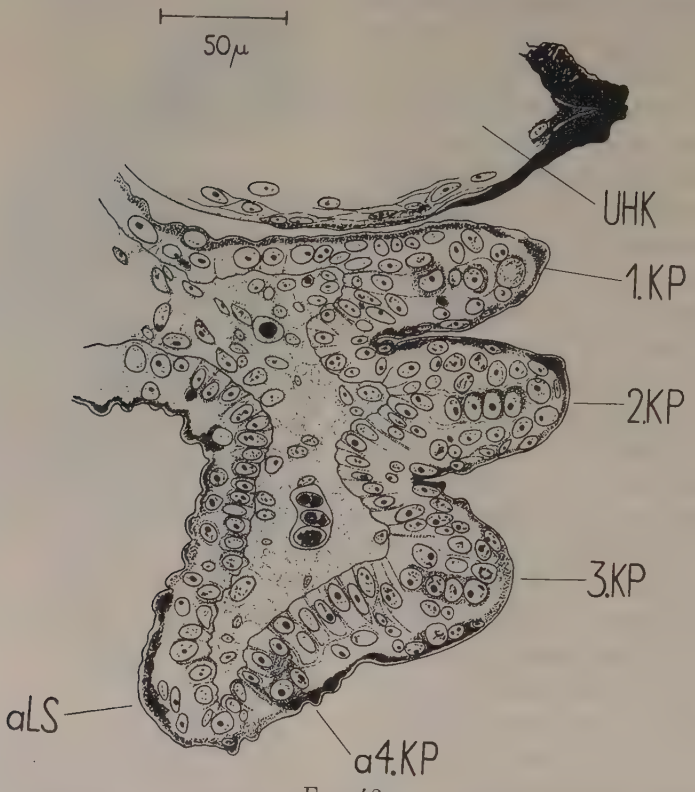


Fig. 42.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der Unterlippe (mediane Partie) unmittelbar vor dem Zustandekommen ihrer Thyroxinempfindlichkeit (UHK = unterer Hornkiefer, KP = Kammplatten, *a* 4. KP = Anlage der vierten Kammplatte, *a* LS = Anlage des Lippensaumes).

angeordneten Myofibrillen auf. Die kontraktile Substanz der Muskelfaser wird von verschiedenen Autoren als „Paraplasma" dem aus undifferenziertem Cytoplasma und Kernen bestehenden „Sarkoplasma" gegenübergestellt (Bredt, 1933). Die ganze Muskelfaser ist von einem dünnwandigen Sarkolemm-Schlauch allseitig eingehüllt. Wie Bredt (1933) richtig erkannte, reichert sich das Sarko-

plasma bei der voll entwickelten Muskelfaser des Kaulquappenschwanzes (siehe Fig. 44 A) besonders stark in derjenigen Partie an, die der Epidermis zugekehrt ist. Die Myofibrillen weisen deutliche Querstreifung auf. Die in der Muskelfaser stets in der Mehrzahl vorhandenen Muskelkerne sind meist von gestreckt-spindelförmiger, seltener von gedrungen-ovoider Gestalt. Sie liegen in diesem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium in der Regel exzentrisch, direkt unter dem Sarkolemmschlauch.

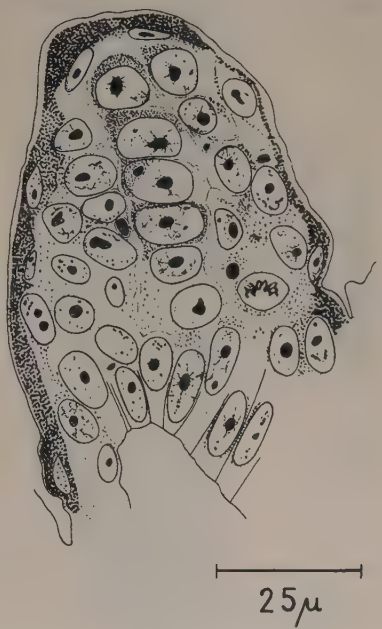


Fig. 43.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der zweiten Kammplatte der Unterlippe unmittelbar vor dem Zustandekommen ihrer Thyroxinempfindlichkeit.

Der Differenzierungszustand, den die Schwanzmuskulatur beim Zustandekommen der Thyroxinempfindlichkeit im Schwanzstamm aufweist, geht aus Fig. 44B, 45 hervor. Wir erkennen, dass er noch beträchtlich von demjenigen des Spätzustandes abweicht. Die eben in Reaktionsbereitschaft tretende Muskelfaser unterscheidet sich von ihrem spätlarvalen Entwicklungszustand insbesondere durch die Lage der Muskelkerne; diese sind hier in der Regel in den zentralen Sarkoplasmastrang eingebettet und nur sehr selten im peripheren Bereich der Muskelfaser anzutreffen. Die bereits in grösserer Zahl in der Muskelfaser vorhandenen Kerne weisen ferner kugelige bis spindelförmige Gestalt auf und enthalten einen mit Hämatoxylin-Heidenhain intensiv anfärbbaren, scharf abgegrenzten, rundlichen Nukleolus. Der zentrale Sarkoplasmastrang ist bereits von mehreren Fibrillenbündeln umgeben, die ihrerseits durch einen äusseren, spärlich entwickelten Sarkoplasmamantel vom Sarkolemm-Schlauch getrennt werden. Die in intensiver Vermehrung begriffenen Myofibrillen zeigen in diesem Entwicklungsstadium bereits deutliche Querstreifung. Die Struktur des Sarkoplasmas ist

eine feinkörnige. Vor allem im zentralen Strang sind noch ganze Scharen von rundlichen und ovoidförmigen Dotterkörnern, deren Grösse ziemlich starken Variationen unterworfen ist, in das undifferenzierte Cytoplasma der Muskelfasern eingelagert.

Das Axenskelett des Schwanzstammes besteht aus der Chorda und dem skeletogenen Bindegewebe. Die Chorda stellt bei der

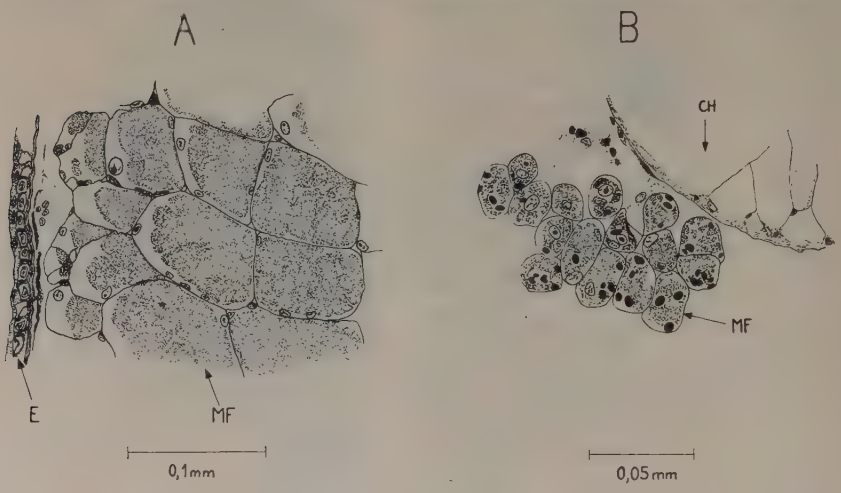


Fig. 44.

Rana temporaria. Querschnittsbild der Schwanzmuskulatur einer maximal entwickelten Kaulquappe (A) und einer Larve, deren Schwanzstamm eben die Reaktionsgereitschaft gegenüber dem Thyroxin erlangt hat (B). E = Epidermis, CH = Chorda dorsalis, MF = Muskelfaser.

Anurenlarve einen dünnen und rundlichen, sich nach der Schwanzspitze hin verjüngenden Stab dar, der aus den typischen Blasenzellen aufgebaut ist. Bei der maximal entwickelten Kaulquappe wird das fein strukturierte Chordaepithel, die Keimschicht der Chordazellen, von einer ca. 5—6 μ dicken Membran umspannt (siehe Fig. 46 A), die deutlich eine massive Innenschicht (sekundäre Chordascheide, Faserscheide) und eine feinere, stärker färbbare Aussenschicht (primäre Chordascheide, elastische Scheide) erkennen lässt. Das die Membran umhüllende perichordale Bindegewebe (tertiäre Chordascheide, skeletoblastische Schicht) besteht aus langen, spindel- bis balkenförmigen Zellkernen und Fasern. Knorpel lässt sich im Axenskelett des vollentwickelten Kaulquappenschwanzes nicht nachweisen (Schauinsland, 1906).

Fig. 46 B zeigt den Differenzierungszustand des Axenskelettes bei einer Larve, in deren Schwanzstamm sich eben die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Thyroxin konstituiert hat. Die Chorda ist auf dieser Altersstufe durch die Ausbildung der Blasenzellen, des Chordaepithels und der primären Chordascheide gekennzeichnet. Die für den Spätzustand charakteristische Faserscheide ist noch nicht nachweisbar. Die Blasenzellen haben bereits ihre typische Form und Grösse angenommen. Sie sind stark vakuolisiert und ihr Cytoplasma bildet nur noch einen spärlichen Saum. Die primäre Chordascheide umspannt als feine, ca. 1 μ dicke Membran das Chordaepithel, dessen Cytoplasma noch grosse Mengen an Pigmentkörnchen aufweist. Von aussen her dringen verästelte Mesenchymzellen gegen die Membran vor und beginnen sich an diese anzulagern; sie stellen die Anlage der skeletoblastischen Schicht (tertiäre Chordascheide) dar.

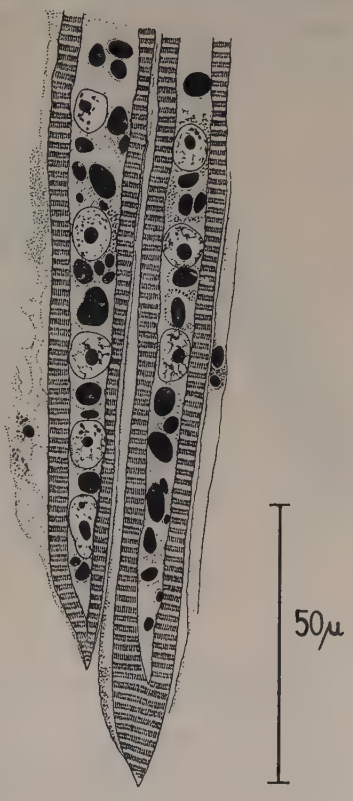


Fig. 45.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der Muskulatur des Schwanzstammes bei dessen Bereitschaftsbeginn.

4. *Das Verhalten der Hinterextremitätenanlage.*

Die Entstehung der Hinterextremitätenknospe aus dem determinierten, aber noch undifferenzierten Anlagematerial (Extremitäten-Scheibe) kann — wie aus den eigenen Versuchen hervorgeht — durch das Thyroxin nicht beeinflusst werden; sie erfolgt nach einer auf früher Entwicklungsstufe einsetzenden Thyroxinbehandlung synchron bei Versuchs- und Kontrolltieren. Diese Feststellung steht im Einklang mit den Befunden von Champy und Radu (1931) sowie denjenigen von Alphonse und Baumann (1933).

Bei Bereitschaftsbeginn stellt sich die Hinterbeinanlage als eine flache Mesenchymknospe dar, die von einem zweischichtigen Epithel überzogen wird (siehe Fig. 47). Das Epithel sitzt einer scharf konturierten Basalmembran auf und wird durch einen feinen Cuticularsaum nach aussen hin abgegrenzt. Die Zellen der äusseren Epithelschicht zeichnen sich durch ihren reichen Gehalt am Pigmentkörnern aus. Das Mesenchymgewebe ist auf dieser

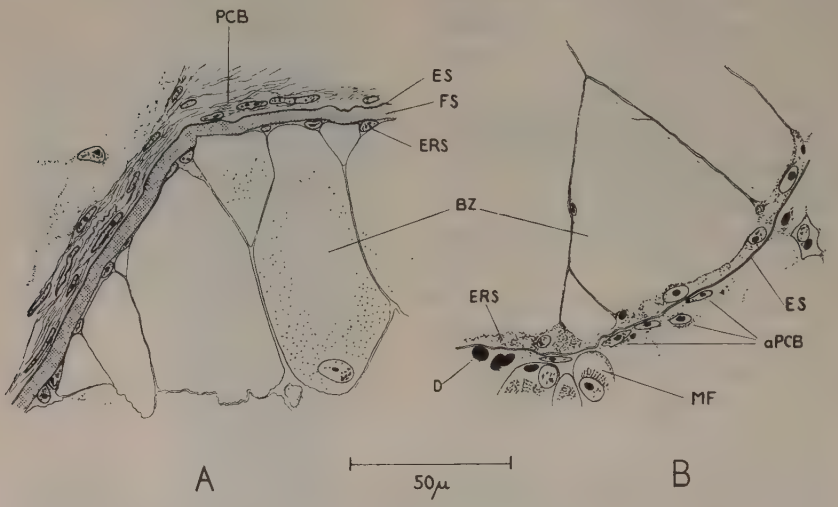


Fig. 46.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der Schwanzchorda einer maximal entwickelten Kaulquappe (A) und einer Larve, deren Schwanzstamm eben die Thyroxinempfindlichkeit erlangt hat (B). BZ = Blasenzellen; ERS = epitheliomorphe Rindenschicht oder Chordaepithel, FS = Faserscheide oder sekundäre Chordascheide; ES = elastische Scheide oder primäre Chordascheide; PCB = perichordales Bindegewebe; aPCB = Anlage des letzteren; MF = Muskelfaser; D = Dotterkorn.

Altersstufe völlig frei von Pigmentzellen. In das Cytoplasma sind noch zahlreiche Dotterkörner eingelagert. Die dichtgescharten Kerne der Mesenchymzellen sind gleichmässig in der Hinterextremitätenknospe verteilt; sie lassen keine blastematöse Anhäufung erkennen, die als Skelettanlage zu deuten wäre. Irgend welche von innen in die Mesenchymknospe einwuchernde oder sich aus dem Knospenmesenchym autonom differenzierende Muskelfasern und Blutgefässe können bei der Durchsicht der Serienschnitte auf diesem Entwicklungsstadium nicht festgestellt werden.

Die Hinterextremität weist demnach bei Bereitschaftsbeginn einen bedeutend geringeren Grad der Differenzierung auf als Schwanzstamm, Unterlippe und Hornkiefer; ihre Struktur ist noch eine ausgesprochen embryonale. Während bei den in Reaktionsbereitschaft tretenden larvalen Bezirken die charakteristischen Histo-Strukturen der betreffenden Organe in der Regel

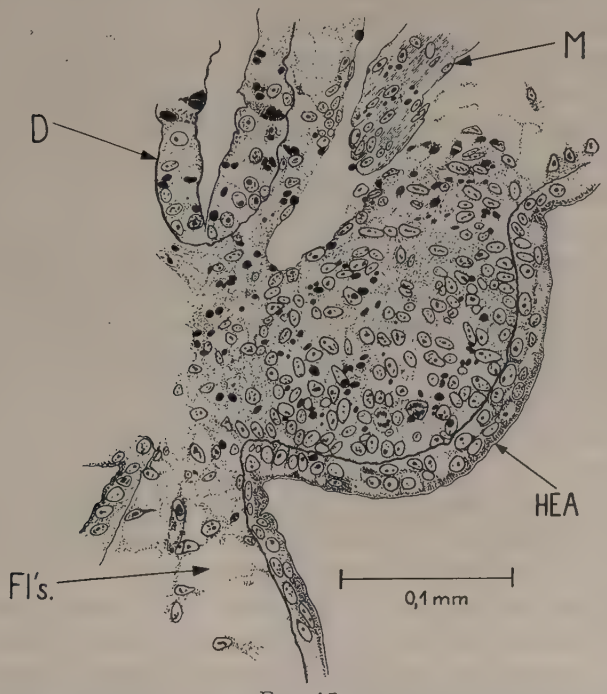


Fig. 47.

Rana temporaria. Differenzierungszustand der Hinterextremitätenanlage beim Zustandekommen ihrer Thyroxinempfindlichkeit (D = Darm; Fl's = Flossensaum; HEA = Hinterextremitätenknospe; M = Muskulatur).

bereits angelegt sind, so ist dies bei der in den Zustand der Thyroxinempfindlichkeit gelangenden Hinterextremitätenknospe noch keineswegs der Fall, denn es lassen sich in ihr auf dieser Altersstufe weder Muskelfasern noch Zentren der Knorpelbildung feststellen. Es scheint sich somit auch hinsichtlich des für den Bereitschaftsbeginn ausschlaggebenden minimalen Differenzierungsgrades ein gegensätzliches Verhalten zwischen Anlagebezirken mit larvaler und solchen mit adulter Determination zu manifestieren.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Untersuchung setzte sich zum Ziel, das Verhalten des Metamorphose-Reaktionssystems gegenüber dem Thyroxinreiz bei verschiedenen Larvenstadien von *Rana temporaria* zu studieren. Dabei beschränkten wir uns zunächst auf die Abklärung der Frage nach dem Zustandekommen der Frühbereitschaft des Reaktionssystems. Durch eine eingehende Analyse der Thyroxinmetamorphose erarbeiteten wir uns die Grundlagen, die zur Durchführung von Untersuchungen über die Reaktionsleistungen verschiedener Entwicklungsstadien erforderlich sind. Die Befunde über den regionalen Ablauf des Induktionsvorganges bei reaktionsbereiten Anurenlarven ermöglichten es, Vorstellungen über die Auslösung von Metamorphose-Reaktionen bei jungen Entwicklungsstadien, die bereits vor dem Zustandekommen ihrer Reaktionsbereitschaft unter den Einfluss überschwelliger Thyroxin-Aussenkonzentrationen gelangen, zu entwickeln. Auf diesen Vorstellungen aufbauend gelang es, ein indirektes Verfahren zur Bestimmung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns auszuarbeiten.

1. *Determination und Etablierung der Reaktionsbereitschaft.*

Die Versuchsergebnisse erlauben es uns, in der Frühentwicklung des Metamorphose-Reaktionssystems zwei Prozesse auseinanderzuhalten, die sich nicht nur hinsichtlich ihrer zeitlichen Abstufung, sondern auch ihrem Wesen nach grundsätzlich voneinander unterscheiden. Der eine dieser beiden Vorgänge betrifft die Determination des Bereitschaftszustandes. Aus den Transplantationsversuchen von Schwind (1933), Nakamura (1935) und Geigy (1937/1938) geht hervor, dass bei den Amphibien bereits im Schwanzknospenstadium resp. schon in der Neurula die Entscheidung darüber gefallen ist, ob aus einem bestimmten Keimbezirk entweder ein Organ hervorgeht, das die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenhormon erlangt, oder ein solches, das gegenüber dem Schilddrüsenreiz dauernd unempfindlich bleibt. Es wird ferner die spezifische Weise (Abbau, Entwicklungsbeschleunigung oder Umgestaltung) festgelegt, in der die zur Thyroxin-

empfindlichkeit determinierten Anlagebezirke nach Erlangung ihrer Reaktionsbereitschaft auf den Metamorphose-Auslöser anzusprechen vermögen. Durch einen zweiten Prozess, den wir als Etablierung des Bereitschaftszustandes bezeichnet haben, erlangt das determinativ vorbereitete Metamorphose-Reaktionssystem sukzessive seine Funktionstüchtigkeit, indem sich die Thyroxinempfindlichkeit in den hierzu prädestinierten Anlagebezirken konstituiert. Das Reaktionssystem tritt aber unter normalen Lebensbedingungen vorerst noch nicht in Aktion. Es wird erst in den späten Larvenstadien, in denen die Schilddrüse den Metamorphose-Auslöser in überschwelliger Konzentration auszuschütten beginnt, zur Aktivität aufgerufen.

Meine Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, dass die in larvalem, adultem oder larvo-adultem Sinne determinierten Anlagebezirke des Anurenkeimes vorerst noch nicht auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen. Die auf embryonaler Entwicklungsstufe zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke müssen erst eine Entwicklungsphase durchlaufen, ehe sie in den Zustand der Reaktionsbereitschaft gelangen (Phase des Heranreifens zur Reaktionsbereitschaft). Determination und Etablierung der Thyroxinempfindlichkeit sind somit keine synchron verlaufenden Entwicklungsvorgänge.

Mit Hilfe eines auf dem Induktionstest beruhenden indirekten Verfahrens konnte ich für Flossensaum, Unterlippe, Hornkiefer, Operkulum, Schwanzstamm und Hinterextremitätenanlage den Nachweis dafür erbringen, dass sich die Thyroxinempfindlichkeit bei *Rana temporaria* nicht erst im Stadium der typischen Jungkaulquappe, sondern bereits früher, nämlich während der Umwandlung der maximal entwickelten Junglarve in die Jungkaulquappe (Uebergangsphase) sukzessive in verschiedenen Anlagebezirken konstituiert. Leider konnte ich den normogenetischen Bereitschaftsbeginn der Zungenanlage und des Spiraldarmes infolge methodischer Schwierigkeiten bis jetzt noch nicht genau ermitteln. Meine vorläufigen, rein qualitativen Befunde lassen aber keinen Zweifel darüber bestehen, dass sich der Bereitschaftszustand auch in diesen Körperbereichen vor dem Zustandekommen der typischen Jungkaulquappenform etabliert. Ich konnte feststellen, dass sich nach einer im Stadium der frisch geschlüpften Junglarve einsetzenden Thyroxinbehandlung nach Ueberschreiten des Jungkaul-

quappen-Stadiums sowohl an der Zungenanlage als auch am Spiraldarm charakteristische Metamorphose-Reaktionen abzuzeichnen beginnen. Die Zungenanlage antwortet auf den frühzeitig verabreichten Thyroxinreiz mit Entwicklungsbeschleunigung und ragt schliesslich bei ungefähr 8 pe-Tage alten Versuchstieren (Larvenalter auf Standard-Aufzuchtbedingungen bezogen) als weissliches Zäpfchen aus dem klaffenden Mund hervor (vergl. die Ergebnisse von Romeis, 1923). Entsprechend erfährt der kaum richtig zur Ausbildung gelangende Spiraldarm bereits auf diesem frühen Entwicklungsstadium jene charakteristischen Veränderungen, die wir bei älteren Behandlungsstadien beobachten: Degeneration des larvalen Darmepithels, Ersatz desselben durch eine je nach dem Darmabschnitt mehr oder weniger stark aufgefaltete Mukosa, Neuentstehung einer Muskularis. Champy und Radu (1931), die zu ähnlichen Befunden über die Frühbereitschaft des Spiraldarmes bei *Bombinator*-Larven gelangten, vermuten, dass die Anlage des Spiraldarmes jenen Körperbezirk darstellt, der zuerst in den Zustand der Reaktionsbereitschaft gegenüber Schilddrüsenstoffen gelangt: « La sensibilité de l'intestin spiral semble apparaître la première. Les phénomènes si caractéristiques dont l'intestin est le siège s'observent déjà après thyroidisation de larves de *Bombinator* de 10 millimètres qui n'ont encore aucune ébauche de pattes, et ne paraissent avoir que l'intestin de sensible." Die Frage, ob dieser Körperbezirk tatsächlich noch früher als Flossensaum und mediane Unterlippenpartie auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermag, kann allerdings erst dann entschieden werden, wenn es gelingt, mit Hilfe meines quantitativen Verfahrens den normogenetischen Bereitschaftsbeginn des Spiraldarmes einwandfrei zu ermitteln.

2. *Zum Problem der Natur und Wirkungsweise der bereitschaftsbestimmenden Faktoren.*

Die experimentellen Befunde über das Zustandekommen der Reaktionsbereitschaft stellen uns vor ein Problem, das für die Entwicklungsphysiologie in zunehmendem Masse an Bedeutung gewinnt: die Frage nach der Natur und Wirkungsweise der bereitschaftsbestimmenden Faktoren.

Während innerhalb des Formenkreises der Amphibien die metamorphose-auslösenden Faktoren artunspezifische sind, entscheiden

artspezifische Faktoren über die Reaktionsnorm gegenüber dem Schilddrüsenhormon. Versuche, in denen determinierte, aber noch nicht reaktionsfähige Anlagebezirke von Anurenkeimen auf Urodelenkeime transplantiert wurden, zeigen, dass die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenhormon vollkommen unabhängig vom artfremden Transplantat-Empfänger im verpflanzten Material zustandekommt. Nakamura (1935) tauschte auf embryonaler Entwicklungsstufe Schwanzknospen zwischen der Anurenart *Rana japonica* und der Urodelenspezies *Hynobius nebulosus* gegenseitig aus. Die Transplantate entwickelten sich in der Folge herkunftsgemäss in charakteristische Anuren- resp. Urodelenschwänze, wobei allerdings die Epidermis der Transplantate durch diejenige der Wirtslarven verdrängt wurde. Während der Metamorphose von *Hynobius* fiel nun das *Rana*-Transplantat der vollständigen Histolyse anheim. Das Urodelen-Transplantat widerstand hingegen herkunftsgemäss dem Schilddrüsenhormon; da seine vom Transplantat-Empfänger *(Rana japonica)* gelieferte Epidermis dem Abbau verfiel, überdauerte es die Metamorphose als nackter Schwanzstamm. Aus dem Versuch von Nakamura geht nicht nur hervor, dass die Determination zu transitorischer Schwanzmuskulatur (Anuren-Transplantat) während der Gastrulation erfolgt, sondern auch, dass sich die Thyroxinempfindlichkeit unabhängig vom Wirtsmilieu, „autonom-mosaikartig" (Hadorn, 1941) unter dem Einfluss der zelleigenen Erbfaktoren im Anuren-Schwanzstamm-Material etabliert. Wir gelangen damit zur Auffassung, dass im Genom der Anurenarten Erbfaktoren lokalisiert sind, die die Thyroxinempfindlichkeit des Schwanzstamm-Materials determinieren und kontrollieren. Man könnte etwa von bereitschaftsbestimmenden Genen sprechen.

Während des beim Bereitschaftsbeginn erfolgenden Ueberganges von der Thyroxinunempfindlichkeit in den Zustand der Reaktionsfähigkeit ändert sich offenbar die Cytoplasma-Feinstruktur der in Frage kommenden Anlagebezirke. Vergegenwärtigen wir uns das Feinstrukturmodell des reaktionsbereiten Cytoplasmas, das wir früher zur Interpretation der Dosis-Effektkurven entworfen haben (siehe Fig. 13, S. 49). Wir haben die Vorstellung entwickelt, dass im Gelgerüst des reaktionsbereiten Cytoplasmas, wahrschein-

lich an gewissen Seitenketten der Proteinfäden, spezifische Haftpunkte existieren, an denen die Thyroxinmoleküle adsorptiv gebunden zur Wirkung gelangen. Auf Grund dieser Vorstellungen würde jene Feinstrukturänderung des Cytoplasmas, die beim Zustandekommen der Thyroxinempfindlichkeit erfolgt, wahrscheinlich in der Entstehung jener spezifischen Proteinstrukturen bestehen, die, fest in der Zellstruktur verankert, als Reaktionsorte des Thyroxins funktionieren. Die Tätigkeit der bereitschaftsbestimmenden Gene würde dann offenbar darin bestehen, den enzymatischen Aufbau dieser Reaktionsorte im zelleigenen Cytoplasma der zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke einzuleiten und zu steuern.

Durch die genaue Ermittlung des normogenetischen Bereitschaftsbeginns konnte ich zeigen, dass die auf embryonaler Entwicklungsstufe zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke erst eine Phase der Reifung durchlaufen, ehe sie in den Zustand der Reaktionsbereitschaft gelangen. Wir schliessen aus diesem Befund, dass sich die bereitschaftsbestimmenden Gene erst dann auswirken[1] können, wenn die zur Thyroxinempfindlichkeit prädestinierten Anlagebezirke einen ganz bestimmten minimalen Differenzierungsgrad erfahren haben. Wir fanden, dass dieser Differenzierungsgrad ein verschiedener für Anlagebezirke mit larvaler und solche mit adulter Bestimmung ist. Während bei den in Reaktionsbereitschaft tretenden larvalen Bezirken die charakteristischen Histostrukturen ihres spätlarvalen Entwicklungszustandes bereits angelegt und in intensiver Differenzierung begriffen sind, repräsentiert die in den Zustand der Thyroxinempfindlichkeit gelangende Hinterextremitätenanlage erst den Zustand der flachen Mesenchymknospe, in der weder Muskelfasern noch Knorpelanlagen erkennbar sind, d. h. noch einen ausgesprochen embryonalen Differenzierungszustand.

Damit die Thyroxinempfindlichkeit in einem bestimmten Anlagebezirk zustandekommen kann, müssen demnach nicht nur bereitschaftsbestimmende Erbfaktoren im arteigenen Genom vor-

[1] Wir unterscheiden streng zwischen dem uns unbekannten Aktivitätsbeginn der Gene und dem feststellbaren Beginn ihrer Auswirkung (Expressionsbeginn).

handen sein, sondern der zur Erlangung der Reaktionsbereitschaft determinierte Bezirk muss erst in einen bestimmten Zustand minimaler Differenzierung gelangen, der die Auswirkung der bereitschaftsbestimmenden Gene ermöglicht. Beim Erreichen dieses Entwicklungsgrades sind im Cytoplasma des in Frage kommenden Anlagebezirkes offenbar die Baumaterialien bereitgestellt und die Reaktionsbedingungen zustandegekommen, die für den enzymatischen Aufbau der Reaktionsorte erforderlich sind. Während des Reifungsprozesses, den die auf embryonaler Stufe zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke durchlaufen, ehe sie die Reaktionsbereitschaft erfahren, stellen sich also offenbar jene Cytoplasmabedingungen ein, die Vorbedingung für die genkontrollierte Synthese der Reaktionsorte des Thyroxins sind.

Wir sind uns bewusst, dass die hier entwickelten Vorstellungen über die Natur und Wirkungsweise der bereitschaftsbestimmenden Faktoren wohl nur ein unvollkommenes Bild von der Wirklichkeit vermitteln können. Sie mögen aber lediglich dazu dienen, ein von diesem Standpunkt aus bisher von wenigen Autoren bearbeitetes Phänomen in seiner Bedeutung für die Entwicklungsphysiologie zu würdigen und zur Diskussion zu stellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Thyroxin-induzierte Metamorphose bei *Rana temporaria* wird einer biometrischen Analyse unterzogen. Es wird ein objektives Verfahren zur Bestimmung des morphogenetischen Thyroxineffektes und zur Ermittlung der regionalen Latenzzeiten ausgearbeitet.

2. Durch eingehendes Literaturstudium und durch die Analyse des regionalen Metamorphoseablaufs bei Larven, die in reaktionsfähigem Zustand einer überschwelligen Thyroxinbehandlung unterzogen wurden, wird versucht, einen Einblick in den Induktionsmechanismus der Anurenmetamorphose zu gewinnen.

3. Die Konzentrationsabhängigkeit der Thyroxinwirkung wird präzisiert. Die Wirkungskurven des Thyroxins sind durch das Fehlen eines Wendepunktes und durch die mit steigender Thyroxin-Aussenkonzentration allmählich erfolgende Einstellung eines Maximaleffektes gekennzeichnet. Eine Hemmung der Thyroxinwirkung bei massiven Konzentrationen, wie sie von ALLEN (1932) vermutet worden ist, kann innerhalb der Löslichkeitsgrenze des Thyroxins im Kaulquappen-Versuch nicht beobachtet werden.

4. Der Verlauf der Wirkungskurven wird durch die Annahme gedeutet, dass das in den Larvenkörper eingedrungene Thyroxin an seinen im Cytoplasma (retikuläres System) verankerten Reaktionsorten adsorbiert zur Wirkung gelange. Mit Hilfe der Adsorptionshypothese lässt sich eine Beziehung zwischen Thyroxin-Aussenkonzentration und Latenzzeit ableiten, die den empirischen Kurvenverlauf quantitativ richtig zu beschreiben vermag.

5. Verlauf und Temperaturabhängigkeit der frühlarvalen Normogenese von *Rana temporaria* werden präzisiert, da ihre genaue Kenntnis für die experimentelle Analyse der Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems unerlässlich ist.

6. In Uebereinstimmung mit den Befunden früherer Autoren konnte beobachtet werden, dass sich eine auf embryonaler oder frühlarvaler Entwicklungsstufe einsetzende Thyroxinbehandlung erst nach dem Erreichen des Jungkaulquappen-Stadiums sichtbar auszuwirken beginnt. Dieser Tatbestand ermöglicht uns lediglich eine grobe Abschätzung (obere Grenze) des Bereitschaftsbeginns.

7. Die Induktion von Frühmetamorphose-Reaktionen wird diskutiert und verschiedene Spezialfälle der Thyroxinbehandlung noch nicht reaktionsbereiter Anurenkeime und -larven werden in der Form theoretischer Schemata veranschaulicht. Hierauf aufbauend, gelingt es, ein quantitatives Verfahren zur Ermittlung des Bereitschaftsbeginns zu entwickeln und auszuarbeiten.

8. Dieses Verfahren beruht auf der Analyse der Abhängigkeit zwischen Behandlungsbeginn und Latenzzeit (A_e, L — Beziehung). In den A_e, L-Kurven tritt ein markanter Knickpunkt auf. Durch Deduktion der A_e, L — Abhängigkeit wird gezeigt, dass der Behandlungsbeginn, bei dem dieser Knickpunkt auftritt, mit dem Alter identisch ist, in dem sich die Thyroxinempfindlichkeit konstituiert.

9. Die experimentelle Ueberprüfung der theoretisch hergeleiteten A_e, L-Abhängigkeit ergibt eine Uebereinstimmung zwischen empirischem und hypothetischem Kurvenverlauf. Diese Koinzidenz zwischen den theoretischen Folgerungen und den experimentellen Befunden ermöglicht es uns, den normogenetischen Bereitschaftsbeginn verschiedener Anlagebezirke aus der empirischen Lage der in den A_e, L-Abhängigkeiten auftretenden Knickpunkte zu ermitteln.

10. Das Stundenalter, in dem bei *Rana temporaria* die Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenhormon in den zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirken zustandekommt, erweist sich als ein regionalspezifisches. Der Bereitschaftszustand etabliert sich in den von mir untersuchten Anlagebezirken in der folgenden Reihenfolge:

I. Ventraler Flossensaum, dorsaler Flossensaum und mediane Unterlippenpartie.
II. Oberer Hornkiefer.
III. Schwanzstamm, unterer Hornkiefer und laterale Unterlippenpartie.
IV. Linkes Operkulum.
V. Hinterextremitätenanlage.

11. Die Frühbereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems konstituiert sich bei *Rana temporaria* L. nicht — wie bisher angenommen worden ist — erst im Stadium der Jungkaulquappe, sondern bereits während jener Normogenese-Phase, in der sich die Junglarve in die Jungkaulquappe umwandelt, im Flossensaum und in der medianen Partie der Unterlippe schon in einem Entwicklungsstadium, in dem die Larve noch beidseitig äussere Kiemen trägt und in dem die Operkelüberwachsung eben erst in Gang gekommen ist.

12. Aus meinen Versuchen ergibt sich, dass die auf embryonaler Entwicklungsstufe zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke vorerst noch nicht auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen. Sie müssen erst einen ganz bestimmten Dif-

ferenzierungsgrad erfahren, ehe sie in den Zustand der Reaktionsbereitschaft gegenüber dem Schilddrüsenhormon gelangen. Dieser minimale Differenzierungsgrad ist ein verschiedener für Anlagebezirke mit larvaler und für solche mit adulter Bestimmung. Während bei den in Reaktionsbereitschaft tretenden larvalen Bezirken die charakteristischen Histostrukturen ihres spätlarvalen Entwicklungszustandes bereits angelegt und in intensiver Differenzierung begriffen sind, repräsentiert die in den Zustand der Thyroxinempfindlichkeit gelangende Hinterextremitätenanlage noch einen ausgesprochen embryonalen Differenzierungszustand (Zustand der flachen Mesenchymknospe). Ich nehme an, dass sich während des Reifungsprozesses, den die zur Thyroxinempfindlichkeit determinierten Anlagebezirke durchlaufen, ehe sie in den Zustand der Reaktionsbereitschaft gelangen, die spezifischen Cytoplasmabedingungen einstellen, die für die Auswirkung der bereitschaftsbestimmenden Erbfaktoren entscheidend sind.

SUMMARY

1. Thyroxin-induced metamorphosis in Anura has been studied biometrically. An objective method has been established for measuring the morphogenetic effect of thyroxin, and regional reaction times.

2. With this method, dosage-effect relations have been determined. The dosage-effect curves have no point of inflection. The effect of thyroxin at first increases rapidly with increasing concentration, then more slowly, and reaches a maximum which remains constant with further increase in dose. An inhibition of the effect of thyroxin by massive dosage, reported by Allen (1932), could not be observed within the solubility-range of thyroxin.

3. In explanation of the dosage-effect curves, it is assumed that thyroxin which has penetrated into the body of the tadpole is adsorbed on certain structures in the reticular system of the cytoplasm (reaction-points) and exerts its action in the adsorbed state. With the help of this hypothesis we can fit a curve which is in good agreement with the empirical data representing the relation between thyroxin-concentration and duration of latent period.

4. The normal early larval development of *Rana temporaria* and the effect of temperature on rate of development are described in detail. Exact knowledge in these respects is essential for experimental analysis of the process of the establishment of thyroxin-sensitivity.

5. In accordance with the findings of earlier authors, it was observed that the effect of thyroxin treatment in the embryo or young larva with external gills becomes first visible at the stage of the young tadpole. This fact provides only a rough estimation (upper limit) of the time of onset of thyroxin sensitivity.

6. There is a theoretical discussion of the induction of early metamorphic reactions by thyroxin treatment in Anuran embryos and larvae which were not sensitive at the beginning of treatment. On this basis, a quantitative method can be developed for determining the time of origin of thyroxin sensitivity.

7. This method is based on the analysis of the curves in which age at which treatment begins (A_e) is plotted against the duration of latent period (L). There is an abrupt discontinuity in slope in the A_e, L-curves. The A_e, L-function is deduced on the basis of certain assumptions and for defined experimental conditions. It is shown that the age of beginning of treatment corresponding to the discontinuity in slope is in fact identical with the age at which thyroxin sensitivity is established.

8. The theoretically deduced A_e, L-relation coincides with the experimental data. This agreement enables us to determine the beginning of thyroxin sensitivity for each body region, according to the empirically determined discontinuity in slope for that region.

9. The time of appearence of thyroxin sensitivity is not the same for each body-region, but develops successively in the following order:

I. Ventral tail-fin, dorsal tail-fin, and middle part of lower lip.
II. Upper horny jaws.
III. Axis of tail (musculature, skeletal tissue, chorda), lower horny jaws, and lateral parts of lower lip.
IV. Left operculum.
V. Hind-limb bud.

10. The beginning of thyroxin-sensitivity in *Rana temporaria* occurs not at the stage of the young tadpole as has been stated previously, but during the period in which the young larva with external gills is transformed into the young tadpole. In the tail-fin and in the median part of the lower lip sensitivity has already begun at the stage of development in which the larva still has external gills on each side, and operculum formation is just starting.

11. It is concluded from the experiments that the body regions whose thyroxin sensitivity is determined at embryonic stages can not immediately react to thyroxin. They must first reach a minimal degree of histological differentiation before thyroxin sensitivity becomes established. This minimal stage of differentiation is a different one for anlagen of transitory organs (such as the tail), and for organs which are destined to become functional only after metamorphosis (such as the limbs). In the transitory organs the characteristic histological structures of the late larval stage of development are already established, and display intensive differentiation when thyroxin sensitivity begins. On the other hand, the hind-limb bud for instance represents still a typical embryonic stage of differentiation (stage of the flat mesenchyme bud) at the time of onset of reactivity to thyroxin. It is assumed that during this process of acquiring the sensitivity, specific cytoplasmic conditions come into existence, for whose origin hereditary factors are responsible.

ZITIERTE LITERATUR

1928. Abderhalden, E. und Wertheimer, E. *Studien über die Wirkung des Thyroxins auf den tierischen Organismus und insbesondere auf die Wärmeregulation des Gleichwarmblüters.* Pflügers Arch., *219.*

1916. Adler, L. *Untersuchungen über die Entstehung der Amphibienneotenie; zugleich ein Beitrag zur Physiologie der Amphibienschilddrüse.* Pflügers Arch., *164.*

1926. Aleschin, B. W. *Die aktuelle Reaktion des Gewebssaftes bei normaler und beschleunigter Metamorphose von Rana temporaria.* Biochem. Z., *171.*

1935. —— *La colloïde intracellulaire dans les cellules thyroïdiennes.* Bull. d'Histologie, *12.*

1936. —— *Die Schilddrüse in der Entwicklung und in der Metamorphose von Rana temporaria.* Acta Zoologica, *17.*

1916. Allen, B. M. *The results of extirpation of the anterior lobe of the hypophysis and of the thyroid of Rana pipiens larvae.* Science 44. No. 1143.

1918. —— *The results of thyroid removal in the larvae of Rana pipiens.* J. of exp. Zool., *24*/3.

1919. Allen, B. M. *The development of the thyroid glands of Bufo and their normal relation to metamorphosis.* J. Morph., *32.*

1932. —— *The response of Bufo larvae to different concentrations of thyroxin.* Anatom. Record, *54*/1.

1935. Alphonse, P. et Baumann, G. *Contribution à l'étude de la métamorphose expérimentale des amphibiens anoures sous l'action de la thyroxine. La perforation de l'opercule branchial.* Arch. d'Anat., d'Histol. et d'Embryol., *19.*

1943. Astwood, E. B. *The chemical nature of compounds which inhibit the function of the thyroid gland.* J. Pharm. and exp. Therapy, *78.*

1935. Atlas, M. *The effect of temperature on the development of Rana pipiens.* Phys. Zool., *8.*

1934 *a*. Belkin, R. *Influence de la température sur la métamorphose provoquée par la thyroïdine chez Rana temporaria.* C. R. Soc. Biol., *115.*

1934 *b*. —— *Influence de la température sur la métamorphose provoquée par la thyroïdine chez l'axolotl.* C. R. Soc. Biol., *115.*

1921. Bilski, F. *Ueber den Einfluss des Lebensraumes auf das Wachstum der Kaulquappen.* Pflügers Arch., *188.*

1942. Bounhiol, J. J. Le déterminisme des métamorphoses chez les amphibiens. Hermann & C^ie^., Paris.

1906. Braus, H. *Vordere Extremität und Operculum bei Bombinator-Larven. Ein Beitrag zur Kenntnis morphogener Correlation und Regulation.* Gegenbauers Morph. Jahrb., *35.*

1933. Bredt, H. *Histologische Untersuchungen zur Wirkung des Thyroxins im Kaulquappenversuch.* Arch. f. Entw'mech., *129.*

1922 *a*. Champy ,Ch. *L'action de l'extrait thyroïdien sur la multiplication cellulaire. Caractère électif de cette action.* Arch. morph. génér. et expér., *4.*

1922 *b*. —— *Sexualité et hormones.* Doin, Paris.

1931. Champy, Ch. et Radu, L. *Etude quantitative de l'action de la thyroxine sur la métamorphose des Amphibiens.* C. R. Ass. Anat., 26^e^ réunion, Varsovie.

1927. Cotronei, G. *Nuove osservazioni sull'influenza del sistema nervoso in relazione a nutrizione con tiroide nella morfogenesi degli Anfibi Anuri.* Atti Accad. dei Lincei Rendiconti, Ser. 6, *5.*

1916. Doms, H. *Ueber den Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Differenzierung der Organe während der Entwicklung von Rana esculenta.* Arch. f. mikrosk. Anat., *87.*

1930. Etkin, W. *Growth of the thyroid gland of Rana pipiens in relation to metamorphosis.* Biol. Bull., *54.*

1932. —— *Growth and resorption phenomena in anuran metamorphosis.* Physiol. Zool., *5.*

1935. —— *Thyroxin concentration and the metamorphic pattern in anura.* J. exp. Zool., *71.*

1936. Etkin, W. *The development of the thyroid gland.* J. of Morph., *59.*
1947. Fischer, R. *Die Beeinflussung der Thyroxinwirkung durch Vitamin E im Kaulquappen-Metamorphoseversuch.* Z. für Vitaminforschung, *18*, Heft 4.
1929. Fontès, G. und Aron, M. *Mode d'action qualitative et quantitative de la thyroxine synthétique. Son influence sur la métamorphose des larves d'Anoures.* C. R. Soc. Biol., *102.*
1922. Freundlich, H. Kapillarchemie, II. Aufl., Leipzig.
1939. Gasche, P. *Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung von Salamandra Salamandra L. mit besonderer Berücksichtigung der Winterphase, der Metamorphose und des Verhaltens der Schilddrüse (Glandula thyreoidea).* Rev. Suisse de Zool., *46.*
1945. —— *Einfache Aufzuchtmethode von Rana-temporaria-Larven mit Brennesselpulver (Herba Urticae)*, Experientia, *I/5.*
1946 *a.* —— *Zur Frage des Angriffspunktes des Thiouracil.* Experientia, *II/1.*
1946 *b.* —— *Wirksamkeit schilddrüsenhemmender Stoffe auf die Xenopusmetamorphose.* Experientia, *II/1.*
1922. Gayda, T. Arch. di Fisiol., 20, Heft 3: zit. nach Trendelenburg (1934).
1937. Geigy, R. *Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Anurenmetamorphose.* I. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Genf.
1938. —— *Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Anuren- und Urodelenmetamorphose.* II. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Chur.
1941 *a.* —— *Thyroxineinwirkung auf verschieden weit entwickelte Froschlarven.* Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Basel.
1941 *b.* — *Die Metamorphose als Folge gewebsspezifischer Determination.* Rev. Suisse de Zool., *48*, Nr. 9.
1941. Geigy, R. und Portmann, A. *Versuch einer morphologischen Ordnung der tierischen Entwicklungsvorgänge.* Die Naturwissenschaften, *29.*
1906. Goeppert, E. *Die Entwicklung des Mundes und der Mundhöhle mit Drüsen und Zunge; die Entwickelung der Schwimmblase, der Lunge und des Kehlkopfes bei den Wirbeltieren.* In O. Hertwig: Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwickelungslehre der Wirbeltiere, G. Fischer, Jena.
1931/1932. Grant, M. *The mechanism of colloid release from the urodele thyroid during diagnostic stages of metamorphosis (Amblystoma jeffersonianum, Amblystoma opacum).* Anat. Record, *51.*
1912. Gudernatsch, J. F. *Feeding experiments on tadpoles.* I. *The influence of specific organs given as food on growth and differentiation.* Arch. f. Entw' mech., *35.*
1914. —— *Feeding experiments on tadpoles.* II. *A further contribution to the knowledge of organs with internal secretions.* Amer. J. of Anat., *15.*

1889. Gutzeit, E. *Die Hornzähne der Batrachierlarven.* Z. für wiss. Zool., *49.*

1941. Hadorn, E. *Hormonale und genetische Voraussetzungen der Metamorphose.* Rev. Suisse de Zool., *48*, Nr. 9.

1927. Harington, C. R. and Barger, J. *Chemistry of thyroxin.* III. *Constitution and synthesis of thyroxin.* Biochem. J., *21.*

1929. Helff, O. M. *Growth and differentiation of anuran tongue during metamorphosis.* Physiol. Zool., *2.*

1932. —— *Hydrogen-ion concentration of the blood of Anuran larvae during involution.* Biol. Bull., *63/3.*

1929. Helff, O. M. and Clausen, H. J. *The atrophy of anuran tail muscle during metamorphosis.* Physiol. Zool., *2.*

1931. Henschel, H. und Steuber, M. *Ueber die Bedeutung der Schilddrüse für den Stoffwechsel der Amphibien.* Arch. f. exp. Path. *160.*

1889. Héron-Royer et Ch. van Bambeke. *Le vestibule de la bouche chez les têtards des batraciens anoures d'Europe; sa structure, ses caractères chez les diverses espèces.* Arch. de Biol., *9.*

1938. Holtfreter, J. *Veränderungen der Reaktionsweise im alternden isolierten Gastrulaektoderm.* Arch. f. Entw' mech., *138.*

1917. Hoskins, E. R. and M. M. *On thyroidectomy in amphibia.* Anat. Record, *11.*

1919. —— *Growth and development of amphibia as affected by thyroidectomy.* J. of exp. Zool., *29.*

1944. Hughes, A. M. and Astwood, E. B. *Inhibition of metamorphosis in tadpoles by thiouracil.* Endocrinology, *34.*

1923. Huxley, J. S. *Experiments with thyroid preparations on Amphibia.* Quart. J. of exp. Physiol., Suppl. (153).

1929. —— *Thyroid and Temperature in Cold-blooded Vertebrates.* Nature, *123.*

1922. Huxley, J. S. and Hogben, L. T. *Experiments on Amphibian metamorphosis and pigment responses in relation to internal secretions.* Proc. Roy. Soc. Lond., *93 B.*

1947. Hoeber, R. *Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe.* Deutsche Uebersetzung. Stämpfli, Bern.

1920. Jarisch, A. *Ueber die Wirkung der Schilddrüse auf Kaulquappen.* Pflügers Arch., *179.*

1889. Keiffer, H. *Recherches sur la structure et le développement des dents et du bec cornés chez Alytes obstetricans.* Arch. de Biol., *9.*

1915. Kendall, E. C. *A method for the decomposition of the proteins of the thyroid, with a description of certain constituents.* J. of biol. Chem., *20.*

1919. Kollmann, M. *Quelques précisions sur l'accélération de la métamorphose des Batraciens anoures sous l'influence de l'extrait de thyroïde.* C. R. Soc. Biol., *82.*

1914. Kornfeld, W. *Abhängigkeit der metamorphotischen Kiemenrückbildung vom Gesamtorganismus der Salamandra maculosa.* Arch. f. Entw' mech., *40.*

1927. Kosmin, N. P. und Resnitschenko, M. S. *Ueber die Bedeutung der Ca- und K-Jonen für die Wirksamkeit des Thyroxins.* Trans. Lab. Exp. Biol., Zoopark Moskau, *3.*

1927. Kremer, J. *Die Metamorphose und ihre Bedeutung für die Zellforschung.* II. Amphibia. Z. f. mikr. anat. Forschung, *9.*

1931. Krichel, W. *Der Einfluss thyreoidaler Substanzen auf Larven von Bufo viridis und die Bedeutung dieser Stoffe für die Entwicklung der Keimdrüse bis zur Metamorphose.* Zool. Jahrb. (Physiologie), *48.*

1933. Kuhn, O. *Ueber morphogenetische Schilddrüsenhormonwirkungen in frühen Entwicklungsstadien.* Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Klasse.

1945. Lehmann, F. E. *Einführung in die physiologische Embryologie.* Verlag Birkhäuser, Basel.

1945. Linder, A. *Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure.* Birkhäuser, Basel.

1929. Lindeman, V. F. *Integumentary pigmentation in the frog, Rana pipiens, during metamorphosis, with especial reference to tail-skin histolysis.* Physiol. Zool., *2.*

1922. Mayerowna, Z. *La glande thyroïde des Amphibiens au moment de la métamorphose.* C. R. Soc. Biol., *87.*

1936. Meisenheimer, M. *Die jahrescyclischen Veränderungen der Schilddrüse von Rana temporaria L. und ihre Beziehungen zur Häutung.* Z. f. wiss. Zool., *148.*

1939. Moore, J. A. *Temperature tolerance and rates of development in the eggs of Amphibia.* Ecology, *20.*

1932. Morita, S. *Quantitative Untersuchungen über die Schilddrüse von Bufo in Beziehung zur Metamorphose.* J. of Science of Hiroshima Univers., Series B, Div. 1, *2.*

1947. Moser, H. *Ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung des Thyroxins.* Experientia, *III/3.*

1935. Nakamura, O. *Reciprocal transplantation of tails between Urodele and Anuran larvae.* Botany and Zoology Jap., *5.* No. 5.

1936 *a.* —— *Relation between limb development and tail resorption in Anura.* Botany and Zoology Jap., *6.*

1936 *b.* —— *Experiments on the metamorphosis of mouth parts.* Botany and Zool. Jap., *6.*

1942. Needham, J. *Biochemistry and morphogenesis.* Cambridge University Press.

1931. Noble, G. K. *The biology of the amphibia.* McGraw-Hill book Company, Inc. New York and London.

1923. Romeis, B. *Histologische Untersuchungen zur Analyse der Wirkung der Schilddrüsenfütterung auf Froschlarven. I. Einleitung; Versuchsprotokolle; Ergebnisse derselben.* Arch. f. Entw' mech., *98.*

1924. —— *Histologische Untersuchungen zur Analyse der Schilddrüsenfütterung auf Froschlarven. II. Die Beeinflussung der Entwicklung der vorderen Extremität und des Brustschulterapparates.* Arch. f. Entw' mech., *101.*

1945. Roth, P. *Contribution à l'étude de la thyroxine et des substances antagonistes dans la métamorphose expérimentale des Batraciens anoures.* Thèse, Université de Paris.

1932. Rothlin, E. *M. S. 222 (lösliches Anästhesin), ein Narkotikum für Kaltblüter.* Schweiz. Med. W'schr., *62*, Nr. 45.

1924. Sembrat, K. *Recherches expérimentales sur les facteurs provoquant la métamorphose de l'intestin chez les têtards des Anoures (Pelobates fuscus Laur.).* C. R. Soc. Biol., *90.*

1906. Schauinsland, H. *Die Entwickelung der Wirbelsäule nebst Rippen und Brustbein.* In O. Hertwig, Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwickelungslehre der Wirbeltiere. G. Fischer, Jena.

1934. Schreiber, G. *L'applicazione delle leggi d'azione degli ormoni alla metamorfosi degli Anuri.* Arch. Zool. Ital., *20.*

1938. —— *Ricerche sperimentali sulla neotenia degli Urodeli. L'azione della tiroxina sugli innesti xenoplastici di pelle.* Arch. Zool. Ital., *27.*

1926. Schubert, M. *Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen wachsenden und reduktiven Geweben. Erste Mitteilung.* Z. f. mikr. anat. Forschung, *6.*

1927. —— *Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen wachsenden und reduktiven Geweben. Zweite Mitteilung.* Z. f. mikr. anat. Forschung, *8.*

1869. Schulze, F. E. *Ueber cuticulare Bildungen und Verhornung von Epithelzellen bei den Wirbeltieren.* Arch. f. mikr. Anat., *5.*

1922. Schulze, W. *Weitere Untersuchungen über die Wirkung inkretorischer Drüsensubstanzen auf die Morphogenie. II. Neotenie und gesteigertes Wachstum nach Thyroidektomie bei Larven von Rana fusca. Wiederbeginn der Fortentwicklung durch Verfütterung von Rinderschilddrüse.* Arch. f. Entw'mech., *52.*

1924. —— *Weitere Untersuchungen über die Wirkung inkretorischer Drüsensubstanzen auf die Morphogenie. III. Ueber die Sprengung der Harmonie der Entwicklung.* Arch. f. Entw'mech., *101.*

1933. Schwind, J. L. *Tissue specificity at the time of metamorphosis in frog larvae.* J. of exp. Zool., *66*/1.

1926. Steppuhn, O., Pewsner, G. und Timofejewa, A. *Ueber das Wesen der Autolyse. VI. Mitteilung: Die Autoproteolyse ganzer Tierkörper unter verschiedenen Bedingungen.* Biochem. Z., *175.*

1944. Sutter, E. *Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze.* Ber. d. Schweiz. Bot. Ges., *54.*

1922 *a.* Swingle, W. W. *Experiments with Necturus and axolotl thyroid.* Anat. Record, *23.*

1922 *b.* —— *The thyroid glands of perennibranchiate amphibians.* Anat. Record, *23.*

1931. Taniguchi, T. *Experimentelle Studien über die Neotenie bei Amphibien.* Folia Anat. Jap., *9.*

1934. Trendelenburg, P. *Die Hormone, ihre Physiologie und Pharmakologie.* Julius Springer, Berlin.

1921. Uhlenhuth, E. *The effect of iodine and iodothyrine on the larvae of salamanders.* II. *The relation between metamorphosis and limb development in Salamander larvae.* Biol. Bull., *41*, Nr. 6.

1927. —— *Die Morphologie und Physiologie der Salamander-Schilddrüse.* I. *Histologisch-embryologische Untersuchung des Sekretionsprozesses in den verschiedenen Lebensperioden der Schilddrüse des Marmorsalamanders, Ambystoma opacum.* Arch. f. Entw'mech., *109.*

1932. Waddington, C. H. *Experiments on the Development of Chick and Duck-Embryos, cultivated in vitro.* Phil. Transactions of the Royal Soc. *B*, London, *221.*

1936. —— *A failure of induction in normal development.* Brit. J. of exp. Biol., *13.*

1942. Witschi, E. *Hormonal regulation of development in lower vertebrates.* Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, *10* (145).